

**CONTRIBUTION A L'ETUDE
DES VACCINS RIBOSOMAux.**

THÈSE

présentée

à l'UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD de LYON

(Médecine-Pharmacie)

et soutenue publiquement le 9 Juin 1978

pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Gérard NIS

né le 19 Septembre 1952

à PARIS (Seine)



CONTRIBUTION À L'ÉTUDE
DES VACCINS RIBOSOMIAUX

THÈSE

présentée

Digitized by the Internet Archive
in 2026

pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire
par

Guillaume NIS

né le 10 Septembre 1852

APPELÉ (Sous)

**CONTRIBUTION A L'ETUDE
DES VACCINS RIBOSOMAux.**

THÈSE

présentée

à l'UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD de LYON

(Médecine-Pharmacie)

et soutenue publiquement le 9 Juin 1978

pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Gérard NIS

né le 19 Septembre 1952

à PARIS (Seine)



CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DES VACCINS RIBOSOMIAUX.

THÈSE

présentée

à l'UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD de LYON

(Médecine-Pharmacie)

et soutenue publiquement le 9 juin 1928

pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire



Cl. 101 N° 15

du 19 septembre 1928

à PARIS (Seine)



PERSONNEL ENSEIGNANT DE L'ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

- DIRECTEUR Monsieur le Professeur FROGET
- DIRECTEURS HONORAIRES Messieurs les Professeurs TAPERNOUX,
FLORIO

PROFESSEURS

- Pharmacie et Toxicologie M. LORGUE
- Anatomie descriptive - Extérieur - Anatomie appliquée M. BARONE
- Physiologie - Thérapeutique - Pharmacodynamie M. BOST
- Histologie - Embryologie - Anatomie Pathologique M. TISSEUR
- Hygiène et Industrie des Aliments d'Origine Animale M. FLACHAT
- Parasitologie et Maladies Parasitaires M. EUZEBY
- Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores -
Législation Vétérinaire M. FONTAINE
- Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour M. COTTEREAU
- Technique chirurgicale - Pathologie chirurgicale M. COULON
- Obstétrique - Pathologie de la Reproduction M. BERTRAND
- Pathologie générale - Microbiologie - Immunologie M. OUDAR
- Ethnologie - Zootechnie - Economie Rurale M. FROGET
- Botanique appliquée - Agronomie - Alimentation M. WOLTER
- Physique et Chimie biologiques et médicales M. JOUBERT
- Maladies Contagieuses - Zoonoses - Législation Sanitaire

PROFESSEURS SANS CHAIRE

- MM. CHANTEGRELET, DELATOUR, DESCHANEL, JEAN-BLAIN, LAPRAS, LE NIHOUE.

MAITRES DE CONFERENCES

- MM. BOIVIN, GASTELLU, MOUTHON.

MAITRES-ASSISTANTS AGREGES - M. PRAVE.

MAITRES-ASSISTANTS

- Mme CHAUVE, MM. FRANCK, FAU, GARNIER, GEVREY, GOUY, KECK, LABE, M^{le} LAVAL,
M. LEGEAY, Mme RACHAIL, M. RICHARD.

ASSISTANTS

- MM. BELLI, BEZEAUD, CHEVRIER, M^{le} COURSAT, MM. DEGUELLE, DEMONT, DESCOTES, EUZEBY,
M^{le} FLEURY, GENIN, MOREAU, NEYRET, PERROTIN, Mme SIMONET, M. SOTTIAUX.

EXAMINATEURS DE LA THESE

<u>Président</u>	: M. le Professeur SEPETJAN de la Faculté de Médecine.
<u>Premier Assesseur</u>	: M. le Professeur FONTANGES du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées.
<u>Deuxième Assesseur</u>	: M. le Professeur OUDAR de l'Ecole Nationale Vétérinaire.
<u>Troisième Assesseur</u>	: M. le Professeur MOUTHON de l'Ecole Nationale Vétérinaire.

L'Université Claude Bernard (Médecine-Pharmacie) de LYON et l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon déclarent que les opinions émises dans les dissertations qui leur sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur donner ni approbation ni improbation.

A ma femme

A mes Parents et à ma soeur

A ma Famille et à ma belle-famille

A tous mes Amis

A notre Président de Thèse

Monsieur le Professeur SEPETJAN
Titulaire de la Chaire d'Hygiène à l'Université Cl.Bernard LYON I
Biologiste des Hôpitaux

qui nous a fait le grand honneur de porter attention à notre travail et d'accepter la présidence de notre Jury de thèse.

Nous le prions de trouver ici le témoignage de notre reconnaissance et de notre profond respect.

A nos Juges

Monsieur le Médecin en Chef FONTANGES
Maître de Recherches du Service de Santé des Armées
Chef de la Division de Microbiologie du Centre de
Recherches du Service de Santé des Armées
Maître de Conférences à l'Université Cl. Bernard LYON I.

qui nous a inspiré ce travail et nous a guidé dans son élaboration.

Nous le remercions de l'accueil qu'il nous a réservé dans ses laboratoires, de la bienveillance et de la confiance qu'il nous a toujours manifestées.

Nous tenons à lui exprimer notre respectueuse admiration et notre très profonde gratitude.

Monsieur le Professeur OUDAR
Professeur de Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie
à l'Ecole Nationale Vétérinaire de LYON.

Nous lui savons gré de s'être intéressé à notre travail et d'avoir
accepté de le juger."

Nous voudrions qu'il trouve ici l'expression de notre profonde gratitude.

Monsieur MOUTHON
Maître de Conférences Agrégé à l'Ecole Nationale Vétérinaire de LYON

Nous le remercions d'avoir bien voulu se pencher sur notre travail et
d'avoir accepté de le juger.

A Madame COUL'OUY pour sa très aimable participation
et au personnel de la Division de Microbiologie
du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées.

A mes Amis du Laboratoire des Aérosols,
Monsieur ROBERT, Mademoiselle DESOR, Madame SOTON
pour leur accueil et leurs suggestions éclairées.

Nous remercions respectueusement

Monsieur le Médecin Général
Directeur du Centre de Recherches
du Service de Santé des Armées

Monsieur le Directeur
des Recherches et Moyens d'Essais

qui nous ont permis la réalisation de cette thèse.

Nous remercions le Centre d'Immunologie et de Biologie
Pierre FABRE pour l'aide qu'il nous a apportée dans la
réalisation de ce travail.

CONTRIBUTION A L'ETUDE

DES

VACCINS RIBOSOMAux

PAR GERARD NIS

R E S U M E

Une étude bibliographique exhaustive consacrée aux ribosomes bactériens, à leurs méthodes d'obtention, et à leurs propriétés immunogènes conduit à une revue de nombreux travaux actuels les concernant, et aux hypothèses avancées quant à leur rôle dans la protection contre des infections expérimentales. Une étude réalisée sur souris Balb/c démontre le pouvoir protecteur de préparations de ribosomes totaux et d'ARN ribosomiaux de *Diplococcus pneumoniae* et de *Klebsiella pneumoniae*. Un mode d'action à composante humorale a pu être dégagé dans certains cas, par l'utilisation des techniques de séroprévention.

S U M M A R Y

A bibliographical study was made about bacterial ribosome, its preparative techniques and immunogenic properties. Many recent works afforded some hypothesis concerning its role about protective effect against experimental infections. Our experiments, performed in Balb/c mice, have shown a protective effect of whole and RNA ribosomal preparations of *Diplococcus pneumoniae* and *Klebsiella pneumoniae*.

In some cases, a humoral mechanism was pointed out, using seric transfert techniques.

TABLES DES MATIERES

	page
<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>PREMIERE PARTIE</u> : Etude bibliographique	3
<u>CHAPITRE I</u> : Le ribosome	4
- Historique, rôle	4
- Généralités, morphologie	5
- Composition chimique, structure	6
. Les Acides ribonucléiques	6
. Les protéines	8
<u>CHAPITRE II</u> : Obtention et purification	10
- des ribosomes	10
. méthode générale	10
. obtention d'un lysat bactérien	11
. préparation de la fraction particulaire	11
. séparation des ribosomes	11
. un exemple	11
- des composants ribosomaux	13
. précipitation par un alcool	13
. utilisation du phénol	13
. utilisation de certains sels	14
. utilisation d'un acide	14
. utilisation des enzymes	14
. remarque	14
- purifications et résultats	16
. les ribosomes	16
. les protéines	16
. les ARN	16
<u>CHAPITRE III</u> : la vaccination par les ribosomes	18
- Historique, généralités	18
- Efficacité, intérêt	18
- Nature de l'immunogène	22
. les protéines	22
. les ARN	24
. les contaminants	25
- Remarque	25
- Mode d'action	26
. Méthodes d'étude	26
. les inhibiteurs métaboliques	26
. dosages d'anticorps	26
. transferts cellulaires	26
. Spécificité de la réponse immunitaire	27
. Nature de la réponse immunitaire	27
. Mécanismes intimes	28

<u>DEUXIEME PARTIE : Etude expérimentale</u>	30
<u>CHAPITRE I : Matériels et Méthodes</u>	31
- Matériels	31
. les animaux	31
. les préparations vaccinales	31
. les bactéries d'épreuve	32
- Méthodes	32
. vaccination des animaux	32
. réalisation des épreuves	33
. transferts sériques	34
. recherche des anticorps	35
<u>CHAPITRE II : Protocoles et résultats expérimentaux</u>	36
- Etude des ribosomes	36
. ribosomes de K.pneumoniae	36
. ribosomes de D.pneumoniae	38
Etude des transferts sériques	38
. ribosomes de D.pneumoniae	38
. ribosomes de K.pneumoniae	40
Cinétique de la réponse humorale aux ribosomes de D.pneumoniae	40
- Etude des ARN ribosomiaux	47
. protection active conférée par les ARN	47
ARN de K.pneumoniae	48
ARN de D.pneumoniae	48
. Etude des transferts sériques	48
Vaccination avec les ARN de klebsielles	48
Vaccination avec les ARN de pneumocoques	48
<u>TROISIEME PARTIE :</u>	
<u>DISCUSSION</u>	54
<u>CONCLUSION</u>	59
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	60

INTRODUCTION

Découverte il y a déjà plus de 30 siècles par les Chinois, la variolisation est la plus ancienne application connue de ce que Pasteur devait appeler vaccination, en hommage aux remarquables travaux de JENNER au XVII^e siècle.

Le principe du procédé jennérien, empiriquement découvert, et longtemps limité au cas de la variole, ne révéla sa portée générale et l'étendue de ses ressources que le jour où PASTEUR, ayant découvert la nature animée des contagés, put les cultiver à l'état pur et les soumettre à des influences capables d'abaisser leur virulence, ouvrant ainsi l'ère de la prévention et de la thérapeutique spécifique.

C'est ainsi que les premières investigations vaccinales furent faites avec des germes vivants atténués (par le temps, la chaleur ou le formol) et vivants virulents (en utilisant une autre voie d'inoculation que la voie d'infection naturelle).

En 1887 CHAMBERLAND et ROUX réalisèrent de grands progrès en montrant que, pour certaines infections, tout au moins, il est possible d'immuniser en injectant, non les microbes vivants normaux ou atténués, mais simplement des bactéries tuées, ou plus simplement encore des produits microbiens. Cette méthode devient très importante lorsqu'on réussit à l'appliquer à la prévention de certaines maladies humaines redoutables telles que le choléra, la peste, et surtout la fièvre typhoïde.

Mais c'est sans doute à cause des multiples problèmes gravitant encore autour de la vaccination (auto-anticorps, pouvoir pathogène résiduel, allergies) que J. BORDET, dans son traité d'Immunologie, écrivait en 1939 :

"Le produit microbien doué du pouvoir vaccinant le plus marqué, ne se découvre pas toujours aisément et son isolement est fréquemment difficile". "Il est clair que du point de vue de la composition chimique, une culture est un ensemble extrêmement complexe qui doit renfermer, à côté des substances dont l'introduction dans l'organisme est susceptible d'y provoquer la réaction d'immunité, diverses matières inutiles ou nuisibles.

Tout un travail d'analyse s'est effectué sous l'influence de cette idée directrice qu'il fallait extraire les produits ayant une valeur vaccinnante et rejeter les autres".

Cette conception s'est affirmée par l'observation ultérieure que les vaccins vivants sont de meilleurs immunogènes que les vaccins tués, suggérant ainsi l'existence d'antigènes labiles détruits par les procédés de préparation des vaccins (25,26).

Grâce aux techniques nouvelles de purification et d'analyse, les quinze dernières années ont vu de nombreuses équipes de chercheurs s'intéresser à l'immunologie des composants bactériens subcellulaires, et notamment des ribosomes.

Les connaissances acquises aujourd'hui quant à l'utilisation des ribosomes en tant que vaccins, bien que fragmentaires et même quelquefois contradictoires semblent pourtant se révéler prometteuses.

Nous nous proposons d'exposer les résultats d'un travail que nous avons effectué en vue d'étudier l'efficacité et éclaircir le mode d'action de quelques préparations ribosomales.

A cette fin, notre étude a été divisée en trois parties :

- La première, d'ordre bibliographique sera essentiellement consacrée au ribosome bactérien et à une mise au point des multiples travaux menés sur l'immunologie de ce composant cellulaire.
- La seconde, d'ordre expérimental, après un exposé des matériels et méthodes utilisés aura pour rôle de présenter les résultats obtenus.
- La dernière partie, après discussion des résultats, sera consacrée aux conclusions qui peuvent en être tirées.

PREMIERE PARTIE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Avant d'envisager la vaccination par les ribosomes, proprement dite (chapitre III), nous nous sommes proposés de rappeler certaines notions fondamentales concernant le ribosome (chapitre I), ainsi que ses méthodes d'obtention et de purification (chapitre II). Nous verrons que, dans une certaine mesure, elles permettent d'éclairer certains points obscurs des résultats obtenus avec la vaccination par les ribosomes.

CHAPITRE PREMIER

LE RIBOSOME

A - Historique, rôle

Deux constatations présidèrent, dans les années 30, à la découverte des ribosomes :

- Ce fut d'abord BRACHET (14), en 1933, qui supposa que la plus grande partie de l'acide ribonucléique (ARN) cellulaire était localisée dans le cytoplasme. La confirmation en fut faite par BEHRENS (10) en 1938.
- Puis CASPERSON (22) et BRACHET (15), étudiant les cellules séricigènes du ver à soie, relièrent directement le taux de synthèse protéique à la quantité d'ARN présente dans les cellules.

La découverte revient, en 1938, à CLAUDE (23) qui, étudiant le Sarcome de Rous sur poulet, découvre à côté des particules virales, de "petits granules" ou "microsomes" se retrouvant également chez le poulet non infecté.

En 1956, PALADE et SIEKEVITZ (77) confirment les vues de CLAUDE en montrant que la basophilie du cytoplasme est due à des particules ribonucléoprotéiques de 200 Å de diamètre qui, dès lors, seront appelées ribosomes; le terme de microsomes est désormais réservé à la fraction particulière, isolée au cours des processus d'extraction, et contenant outre les ribosomes, des fragments de réticulum endoplasmique.

C'est LITTLEFIELD (60), en 1955, qui fait la claire démonstration que les ribosomes sont les sites où les acides aminés sont assemblés pour constituer les protéines.

Remarque : Les récents travaux de BOSCH (13) et HASELKORN (46) font le point de l'acquis dans le domaine des mécanismes intimes de la protéino-synthèse, qui ne seront pas abordés ici.

B - Généralités, morphologie

A raison de plusieurs milliers par cellule (15000 environ dans une bactérie *Escherichia coli*), les ribosomes sont néanmoins en nombre très variable selon la cellule et son activité fonctionnelle ou élaboratrice.

Dans les cellules des procaryotes, où manque le réticulum endoplasmique, les ribosomes sont dits libres car éparés dans le cytoplasme; ils sont alors souvent groupés par cinq ou plus, chacun paraissant transitoirement lié à son voisin par un fin filament d'ARN messager. Cette disposition particulière en polysome (ou polyribosome) correspond aux phases de protéinosynthèse des ribosomes, qui alternent avec des phases de repos, définissant ainsi un cycle ribosomal auquel tous les ribosomes sont soumis.

Chez les eucaryotes, à côté des ribosomes libres, figure également une population de "ribosomes liés" formant, avec le réticulum endoplasmique auquel ils sont accolés, l'ergastoplasme. Ces ribosomes seraient, pense-t-on, plus spécifiquement destinés à l'élaboration de protéines d'excrétion extra-cellulaire.

Les ribosomes montrent, quel que soit le type cellulaire dont ils sont issus, une unité de constitution. Néanmoins les ribosomes d'eucaryotes se distinguent de ceux des procaryotes par une taille sensiblement supérieure; ils ont, en effet, un poids moléculaire de $4,6.10^6$ daltons (contre $2,7.10^6$ daltons) et consécutivement une constante de sédimentation supérieure (80 S contre 70 S).

Morphologiquement, le ribosome des procaryotes (qui seul sera retenu dans l'étude ultérieure) est un petit granule d'environ $200 \times 160 \text{ \AA}$; des études menées, par microscopie électronique notamment, lui reconnaissent deux sous-unités vaguement sphériques de taille inégale : la plus grande de 50 S, l'autre de 30 S. Ces deux sous-unités se dissocient aisément dans certaines conditions ioniques (essentiellement pour les diminutions de concentration en ions Mg^{++} et K^+). Ce phénomène, facilement réversible, est d'ailleurs une des étapes du cycle ribosomal précédemment décrit.

C - Composition chimique, structure

C'est essentiellement le ribosome d'*Escherichia coli* qui a fait l'objet des investigations en ce domaine; c'est de son étude qu'ont été faites les déterminations suivantes :

Le ribosome est de nature nucléoprotéique avec un rapport ARN/protéines proche de 2. On note en outre, en de très faibles proportions, la présence d'ions minéraux (Mg^{++}). Ni glucides, ni lipides n'ont, par contre, pu être détectés. Il a été montré que chaque sous-unité contenait une molécule d'ARN de haut poids moléculaire (la sous-unité 50 S contient en plus un ARN de faible poids moléculaire) et un certain nombre de protéines.

1) Les acides ribonucléiques :

Caractérisés par leur constante de sédimentation, les ARN ribosomaux sont donc au nombre de trois.

. ARN 23 S P.M. $1,1 \times 10^6$

C'est l'ARN de haut poids moléculaire de la sous-unité 50 S. Grâce à différents procédés, dont l'hydrolyse enzymatique, on a pu déterminer en très grande partie la séquence de ses quelque 3000 nucléotides (BRANLANT et Coll.(16)).

. ARN 16 S P.M. $0,5 \times 10^6$

Avec environ 1500 nucléotides (MIDGLEY 67) c'est l'ARN de haut poids moléculaire de la sous-unité 30 S. La détermination de la séquence de ses nucléotides (qui est presque totale aujourd'hui) revient en grande part à EHRESMANN (34).

. ARN 5 S

Isolé de la sous-unité 50 S, l'ARN 5 S de tous les ribosomes est une chaîne d'environ 120 nucléotides, entièrement déterminés pour *Escherichia coli* depuis 1968 (BROWNLEE (19)).

Son rôle, très important pour l'association des ARN avec les protéines, confère à la sous-unité 50 S beaucoup de ses propriétés.

Deux voies permettent de présumer de la structure secondaire de ces ARN :

- la première est l'étude de l'hyperchromicité, pendant la dénaturation par la chaleur, qui montre que 60 à 70% des nucléotides des ARN 16 S et 23 S sont associés en structure secondaire.
- la seconde est l'utilisation de l'hydrolyse enzymatique par les RNAases qui n'affectent que peu de points de la chaîne nucléotidique, attestant ainsi que la plupart des bases sont impliquées dans des structures secondaires ou même tertiaires.

Il est ainsi admis que la chaîne polynucléotidique de l'ARN 16 S est repliée, par endroits, sur elle-même formant une série de boucles, liées entre elles par de courtes zones monocaténaires.

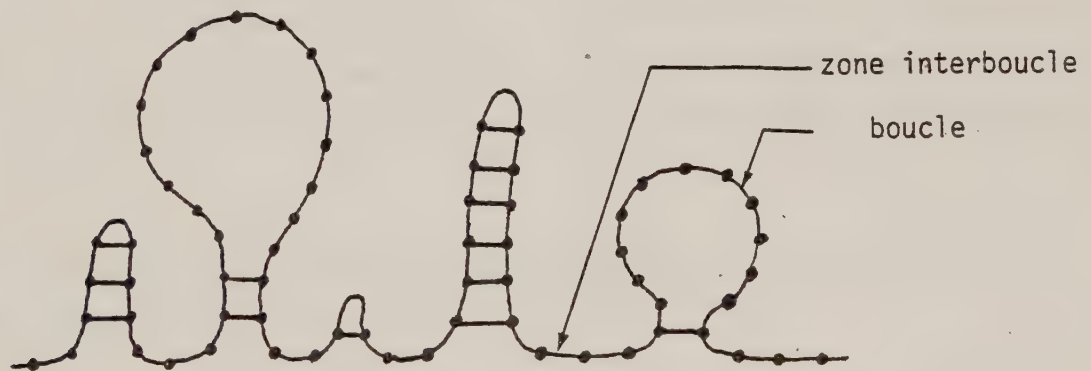


Schéma d'une portion d'ARN dans lequel chaque point figure un nucléotide.

L'action des ARNases se ferait préférentiellement sur ces zones inter-boucles et sur les parties de boucles aux bases non appariées, donc à un seul brin.

Des études stoechiométriques ont montré que l'ARN 23 S aurait sensiblement le même type de structure, mais les informations manquantes sur la séquence ne permettent pas de postuler davantage.

On sait, de même, que l'ARN 5 S possède des chaînes bicaténaires.

Les ARN ribosomaux ont un rôle capital dans l'établissement et le maintien de la structure du ribosome : ils constituent une véritable charpente sur laquelle les protéines prennent place.

2) Les protéines :

En 1971, 55 des protéines ribosomales de *Escherichia coli* étaient déjà identifiées : 21 appartenant à la sous-unité 30 S et symbolisées pour cela par la lettre S (pour small) suivie d'un chiffre de 1 à 21, et 34 provenant de la sous-unité 50 S symbolisées par la lettre L (large) et un chiffre de 1 à 34. En fait ce dénombrement est en partie conventionnel puisque certains facteurs cytoplasmiques protéiques (indispensables au déroulement correct de la protéosynthèse) sont étroitement liés au ribosome et très fréquemment purifiés avec lui. Ainsi, depuis 1974 quelques nouvelles protéines ont été ajoutées à la liste des 55 déjà identifiées.

Le point isoélectrique des protéines ribosomales est connu et leur poids moléculaire se situe entre 9000 pour les plus petites et 35000 pour les plus grosses (à l'exception de la protéine S 1 dont le poids moléculaire atteint 65000).

La séquence en acides aminés est, pour certaines d'entre elles, entièrement identifiée.

La structure du ribosome est la conséquence des multiples liaisons, inter et intramoléculaires, qui se créent entre les ARN et les protéines. Il est actuellement admis qu'un faible nombre des protéines est au contact direct de l'ARN, les autres prenant place par dessus les premières "fixées" à l'ARN.

Certaines hypothèses, quelquefois contradictoires, ont été tirées de la composition chimique et de l'architecture du ribosome :

- JOHNSON (51) suggère que les portions bicaténaires de l'ARN pourraient protéger les protéines, lors du traitement des ribosomes par certaines enzymes protéolytiques.

- BRANLANT et coll. (16) attribuent à la structure secondaire et à la présence des protéines, une activité protectrice vis-à-vis des ARNases pour l'ARN; pour WORCEL (112), c'est la structure quaternaire de l'ARN qui rend la ribonucléase inefficace.

- STANLEY (91) émet l'hypothèse que les protéines ribosomales les plus superficielles peuvent être arrachées au cours de certaines opérations drastiques de décapage du ribosome (notamment par le dodécyl sulfate de sodium : SDS).

CHAPITRE SECOND

OBTENTION et PURIFICATION

A - Des ribosomes

Leur analyse par ultracentrifugation commença, vers les années 50, avec les travaux de PETERMAN et HAMILTON (79), mais la première véritable méthode de préparation revient à TISSIERES (100).

Aujourd'hui ce principe d'isolement des ribosomes reste la base de nombreuses variantes techniques visant à obtenir un produit plus purifié. Une description détaillée des méthodes d'obtention des ribosomes et préparations ribosomales nous est donnée par TAKANAMI (94), pour *Escherichia coli*.

1 - Méthode générale

Les principales étapes sont généralement les suivantes :

a) Obtention d'un lysat bactérien :

A cette fin, la culture bactérienne, est d'abord lavée plusieurs fois, par centrifugations modérées, dans une solution tampon (tampon Tris ou tampon phosphate additionné de chlorure de magnésium).

Les bactéries ainsi lavées sont ensuite détruites selon différents procédés dont essentiellement :

- broyage dans l'alumine
- ultrasons
- cellule à pression.

Certains auteurs (101,123) incluent à ce stade un traitement du lysat par le dodécyl sulfate de sodium (SDS), à faible concentration, pour son effet "décapant".

b) Préparation de la fraction particulaire :

Plusieurs centrifugations à accélération moyenne (25000 → 50000 g) dans du tampon conduisent à l'élimination des bactéries non éclatées et des débris cellulaires.

Les fractions les plus denses se collectent, en effet, dans les culots successifs.

Le surnageant soigneusement prélevé est enfin soumis à une centrifugation forte et prolongée (100 000 → 140 000 g) qui aboutira à la séparation de la fraction microsomale.

c) Séparation des ribosomes :

Le culot microsomal est repris dans une solution de SDS, dans le but d'éliminer les fragments de membrane restés adhérents aux ribosomes. Une ultime centrifugation permet de récupérer la fraction ribosomale en culot.

SPIRIN et coll. (89) conseillent alors un ou plusieurs lavages au chlorure d'ammonium (0,5 M ou 1 M) pour éliminer la ribonucléase.

WELLER (108) élimine ainsi les protéines cytoplasmiques acides des ribosomes d'*Escherichia coli*.

Une autre procédure, employée par KURLAND (57) ainsi que par FOGEL et SYPHERD (39), pour obtenir des ribosomes et sous-unités ribosomales relativement pures, est de provoquer leur précipitation dans le sulfate d'ammonium.

2 - Un exemple

A titre d'exemple, afin de préciser les valeurs des différents paramètres entrant en jeu au cours des phases de la préparation des ribosomes, nous donnerons sous forme de tableau (tableau I) le procédé de DUSSOURD D'HINTERLAND exposé dans son brevet d'invention (33).

Biomasse

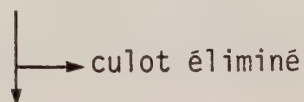
Préculture en flacon
Culture en fermenteur
Centrifugation continue
Lavage des cellules
Centrifugation



Concentrat bactérien

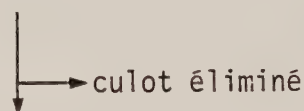
Broyage

Dilution du concentrat (SDS)
Homogénéisation
Broyage 3 à 5 cycles ou 20-30 mn ultrasons
Centrifugation 45 mn 30 000 g

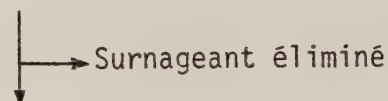


Clarification

Surnageant 30 000 g
Centrifugation 30 mn 55 000 g

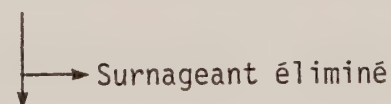


Surnageant 55 000 g
Centrifugation 180 mn à 125 000 g (+ 2°C)

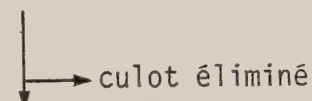


Ribosomes

1er culot 125 000 g
Lavage 40 mn par SDS 0,5% (température ambiante)
Centrifugation 180 mn à 125 000 g (+ 15°C)



2ème culot 125 000 g
Reprise une nuit à + 4°C
Clarification 30 mn à 55 000 g et 0°C



Surnageant = Fraction ribosomale

TABLEAU I - Procédé d'extraction et de purification des ribosomes.

B - Des composants ribosomaux

Si le ribosome peut être isolé de la cellule par des procédés essentiellement physiques, ses composants, par contre, de par la nature nucléoprotéique du ribosome, ne pourront être séparés que grâce à des moyens chimiques.

La méthode d'obtention des protéines ribosomales d'une part, et des acides ribonucléiques d'autre part, est en général une séparation obtenue par la précipitation de l'un ou de l'autre des composants.

Parmi les nombreuses méthodes et variantes utilisées, on peut noter les différents procédés qui aboutissent à travers des rendements variables, à des produits plus ou moins purifiés :

1 - Précipitation par un alcool :

CRESTFIELD (32) utilise l'alcool éthylique à froid; FOGEL et SYPHERD (39), le 2-chloro-éthanol. Après contact prolongé et agitation du mélange alcool-préparation ribosomale, l'ARN rendu insoluble est séparé par centrifugation.

- . la récupération de l'ARN se fait par lavage du précipité dans l'eau pour éliminer l'alcool.
- . l'obtention des protéines est réalisée par dialyse du surnageant contre de l'eau distillée.

2 - Utilisation du phénol :

Une solution saturée de phénol dans un solvant sert d'agent précipitant des protéines. Ce solvant peut être :

- l'eau (2,55)
- un tampon phosphate (102)
- du Tris (41).

La préparation ribosomale est longuement agitée dans cette solution phénolique; une centrifugation permet d'isoler l'ARN dissout dans le surnageant. Cette opération répétée plusieurs fois permet d'obtenir un ARN plus purifié.

3 - Utilisation de certains sels :

WILCOKSON (109) provoque la précipitation des protéines par l'emploi du perchlorate de sodium (Na ClO_4) en solution saturée. Par centrifugation, le surnageant contenant l'ARN est ensuite isolé.

SPITNIK-ELSON (90), LERMAN et coll. (58) traitent les ribosomes avec le chlorure de lithium (Li Cl , 2 M) en présence d'urée (4 M) pour extraire les protéines.

4 - Utilisation d'un acide :

La méthode originale, due à FRAENKEL-CONRAT (40) pour l'extraction des protéines virales, utilisant l'acide acétique à 67% a été modifiée pour être adaptée au ribosome (par addition d'une haute concentration en ions Mg^{++}) par HARDY et coll. (45).

5 - Utilisation des enzymes :

Certains auteurs (101, 119) utilisent les dégradations enzymatiques, par l'emploi des ribonucléases pour obtenir ou purifier les protéines, ou par l'emploi des protéases (pronase, trypsine) pour isoler les ARN.

Rappelons que des controverses existent (112) quant à l'efficacité de telles enzymes vis-à-vis des structures complexes des nucléoprotéines ribosomales.

6 - Remarque :

Fréquemment, les différentes méthodes de préparation indiquées ne sont pas employées seules; elles peuvent effectivement être combinées afin d'augmenter la pureté du produit final.

Ainsi, KALTSCHMIDT et WITTMAN (53) étudient l'extraction par le phénol et l'acide acétique en présence de cations mono et bivalents.

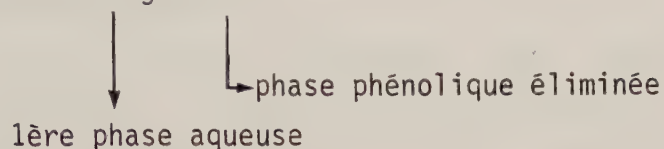
Le chlorure de sodium (2 M) est très souvent employé avec les différentes méthodes pour augmenter les phénomènes de floculation des protéines.

Pour illustrer ces méthodes nous donnerons le schéma des différentes étapes de préparation de l'ARN par le procédé DUSSOURD D'HINTERLAND (tableau II).

Suspension de ribosomes

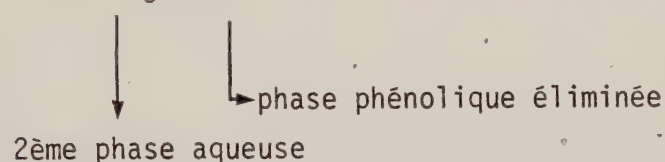
1°) Extraction 10 mn par 1 vol. de phénol 80% à 65°C

Centrifugation



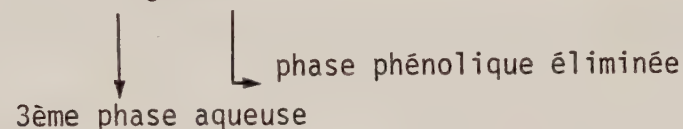
2°) Extraction 10 mn par 1/2 vol. de phénol 80% à 65°C

Centrifugation

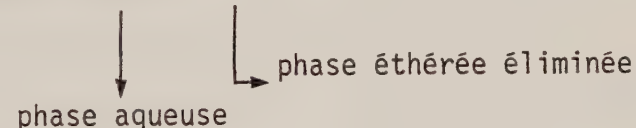


3°) Extraction 10 mn par 1/2 vol. de phénol 80% à 65°C

Centrifugation



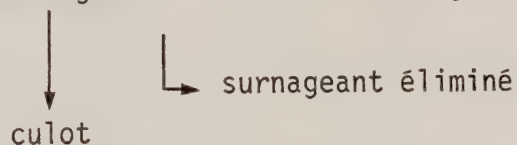
4°) Extration par un volume d'éther



Barbotage d'azote pour éliminer l'excédent d'éther

Précipitation (Na Cl 0,1 M) + 2 vol.alcool éthylique 20°C, 4 heures

Centrifugation 10 mn à 10 000 g



Reprise tampon

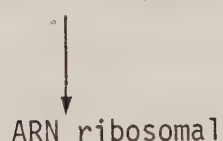


TABLEAU II - Schéma de préparation de l'ARN ribosomal.

C - Purification et résultats

L'utilisation des ribosomes et préparations ribosomales à des fins vaccinales a conduit à la nécessité de connaître avec précision la composition des préparations utilisées (ribosomes, protéines ribosomales, ARN ribosomaux), mais également à employer des méthodes de purification pour obtenir des produits plus standardisés, certains composants étant, en effet, régulièrement ou accidentellement entraînés au cours des processus d'obtention.

1 - Les ribosomes :

Malgré les traitements au S.D.S. et au sulfate d'ammonium, les préparations de ribosomes contiennent encore une proportion non négligeable de contaminants, identifiés ou non (ADN, hexoses ...)

- Travaillant sur *Salmonella typhimurium*, VENNEMAN (101,106) arrive à la détermination suivante :

ARN : 60%; Protéines : 30%; ADN : 4%; Contaminants divers: 6%.

- THOMPSON (98) obtient pour *Diplococcus pneumoniae*,

ARN : 60,5% Protéines : 29,1%; ADN : 6,3%; Hexoses : 4%.

- YOUNG et YOUNG dans leurs premiers travaux (119) sur *Mycobacterium tuberculosis*, obtiennent un produit contenant encore 30% de contaminants, mais par une procédure plus délicate, ils pensent parvenir, plus tard (123), à éliminer totalement ADN et polysaccharides.

2 - Les protéines :

Leur concentration peut être déterminée par la méthode de LOWRY (62). Le procédé d'extraction de FOGEL et SYMPHERD permet de les obtenir sans contaminant polysaccharidique ou ribonucléique, mais elles sont quelquefois accompagnées de protéines cellulaires étrangères au ribosome (51).

3 - Les ARN :

Leur concentration est déterminée par dosage du ribose à l'orcinol (63) ou par spectrophotométrie d'absorption à 260 nm.

Extraits par l'alcool, ils comportent encore une importante quantité de protéines; la technique de Wilcockson en laisse 5 à 7%; par contre la méthode d'extraction de GRIERER et SCHRAMM (41) donne des ARN sans protéine (avec un faible rendement : 25% de l'ARN de départ).

Ces ARN peuvent être purifiés par différentes méthodes dont celle de COX (31) au chlorure de guanine qui permet d'éliminer résidus de protéines et ADN.

CHAPITRE TROISIEME

LA VACCINATION PAR LES RIBOSOMES

A - Historique, généralités

Les premiers travaux immunologiques concernant les ribosomes sont dûs à YOUMANS et YOUMANS (115,116,113, 114, 54); encore croient-ils au début utiliser la fraction mitochondriale qu'ils isolent de *Mycobacterium tuberculosis*. Ce n'est qu'en 1965 qu'ils identifient avec certitude les ribosomes dans leurs préparations et montrent, les premiers, qu'ils possèdent une activité immunogénique contre une infection tuberculeuse expérimentale (118).

La dualité de constitution du ribosome a, ensuite, naturellement conduit à rechercher l'activité propre à chacun des composants (protéines, ARN), en vue surtout d'identifier l'immunogène efficace de ces préparations.

En 1969, ces mêmes auteurs montrent que les antigènes ribosomaux assurent la protection contre une infection à *Mycobacterium tuberculosis* (122) et que des préparations d'ARN ribosomal de bacille tuberculeux s'avèrent aussi efficaces, en tant que vaccins, que les mycobactéries dont ces préparations sont issues (123).

Dès lors les travaux se multiplient et se diversifient, plusieurs espèces bactériennes sont étudiées ainsi que des levures et même des protozoaires (tableau III).

B - Efficacité, intérêt

Différentes voies permettent d'apprécier l'efficacité vaccinnante des ribosomes et préparations ribosomales. Citons quelques-unes de ces techniques qui sont classiques en expérimentation :

Ribosomes de ..	Auteurs	Références
Staphylococcus aureus	Winston et Berry Eisenstein, Winston et Berry	110, 111 35
Streptococcus pyogenes	Schalla et Johnson	85
Pneumococcus pneumoniae	Thompson et Eisenstein Thompson et Snyder Swendsen et Johnson	99 98 93
Neisseria meningitidis	Thomas et Weiss Weiss et Hill	97 107
Salmonella typhimurium	Johnson Misfeldt et Johnson Hoops, Prather, Berry et Ravel Margolis et Bigley Smith et Bigley Venneman et Berry Venneman et Bigley Venneman, Bigley et Berry Houchens et Wright	51, 52 70 47 65 86, 87 103 101 102 48
Pasteurella multocida	Baba	7
" pestis	Johnson-Surgalla	50
" "	Johnson	51
Francisella tularensis	Andron et Eigelsbach	4, 5
Brucella abortus	Corbel	30
Haemophilus influenzae	Lynn, Tewari, Solotorovsky	64
Pseudomonas aeruginosa	Winston et Berry Smith et coll. Lieberman	110 88 59
Vibrio cholerae	Agarwal et Sundararaj Guentzel et Berry Actor, Pitkin et Jensen Jensen, Gregory et coll.	2, 3 42 1 49
Listeria monocytogenes	Coppel et Youmans Suzuki	29 92
Mycobacterium tuberculosis	Youmans et Youmans Portelance, Brasseur, Boulanger	125, 123, 124, 120, 117, 121, 129 81
Candida albicans	Saunders, Solotorovsky, Tewari	84
Histoplasma capsulatum	Feit et Tewari Tewari Tewari et coll. Neuhauser et coll.	38 95 96 74
Toxoplasma gondii	Araujo et Remington	6
Leishmania enriettii	Preston et Dumonde	82

- protection conférée par la vaccination contre une infection expérimentale,
- retard de mortalité, relativement à un témoin après épreuve virulente létale,
- cinétique de la multiplication des germes virulents inoculés à un animal vacciné par rapport à un animal témoin (11),
- titrage d'anticorps.

La plupart des études réalisées à ce jour, et utilisant des animaux de laboratoire variés (souris, cobaye, lapin, poulet) s'accordent à prouver que l'induction d'une immunité protectrice est une propriété commune aux ribosomes d'un large spectre de procaryotes et même d'eucaryotes.

Certes, de nombreuses controverses existent quant à la nature exacte de l'immunogène sur lequel repose l'activité protectrice, mais il a, à maintes reprises, été montré que les ribosomes ou leurs préparations dérivées (protéines, ARN) protégeaient efficacement contre des infections expérimentales homologues.

Seules deux exceptions ont pu être notées :

- JOHNSON et SURGALLA (50) décrivent l'impossibilité de protéger des animaux contre une infection de *Pasteurella pestis* avec des ribosomes de cette souche.
- COPPEL et YOUNG (29) constatent les mêmes faits avec *Listeria monocytogenes*.

Les vaccins ribosomiaux induisent une protection de longue durée et d'un niveau au moins égal à celui obtenu couramment avec les vaccins tués, quelquefois même comparable aux vaccins vivants atténués. VENNEMAN et coll.(102) en font la démonstration pour *Salmonella typhimurium*. En outre ils présentent des caractères intéressants, notamment, pour certains, des phénomènes de protection croisée entre sérotypes

- *Streptococcus pneumoniae* (98)
- *Vibrio cholerae* (49)
- *Neisseria meningitidis* (97)

et pour beaucoup, l'emploi non nécessaire d'adjuvants de l'immunité, trop souvent responsables de phénomènes inflammatoires sévères (26). Néanmoins certains auteurs (YOUNG et YOUNG par exemple) ne peuvent s'en dispenser pour obtenir des niveaux de protection suffisants (123).

L'efficacité de ces préparations est évidemment conditionnée par la dose administrée. Là encore les ribosomes se montrent tout à fait efficaces puisque de bons taux de protection peuvent être obtenus chez la souris avec des doses de l'ordre du γ (10^{-6} g).

- VENNEMAN et BIGLEY (101) protègent des souris contre *Salmonella typhimurium* avec 1 γ (sans l'utilisation d'adjuvant) et 0,1 γ (avec adjuvant) de préparation ribosomale.
- YOUMANS et YOUMANS (123), pour *Mycobacterium tuberculosis*, parviennent à conférer un bon degré d'immunité à des souris recevant 5 γ de préparation d'ARN ribosomal, et quelquefois même avec seulement 0,5 γ .

La haute activité de ce type de vaccin est d'ailleurs confirmée par l'étude de LYNN (64) (portant sur *Haemophilus influenzae*) qui constate des phénomènes de tolérance pour des doses ne dépassant pas 100 γ .

Certains auteurs rapportent une activité antitumorale de ces préparations ribosomales. Les travaux de MILLMANN (68,69), portant sur le bacille tuberculeux, montrent que l'ARN mycobactérien possède une activité inhibitrice sur la croissance de plusieurs fibrosarcomes chez la souris. Cette action n'est pas sans rappeler l'effet du B.C.G. sur les cellules tumorales.

A côté de ces résultats, qui semblent faire des préparations ribosomales de bons vaccins, il faut noter la possibilité de réactions indésirables (hypersensibilité, toxicité).

LOGE et coll. (61) montrent qu'une hypersensibilité aux protéines ribosomales peut être induite chez le cobaye. C'est également le cas des travaux de ORTIZ et ORTIZ (76), et BAKER et coll. (8, 9). Ce phénomène d'hypersensibilité ne semble pas être général puisque YOUMANS et YOUMANS ne le retrouvent pas vis-à-vis de la tuberculine (121).

Malgré le peu d'informations disponibles quant à la toxicité des vaccins ribosomaux, il semble possible de penser que ces préparations en soient dénuées. En effet, seules quelques réactions cutanées inflammatoires ont été rapportées, mais pour de fortes doses (128).

C - Nature de l'Immunogène

C'est une des préoccupations actuelles que de tenter de déterminer s'il existe, dans les préparations de ribosomes utilisées, une fraction plus immunogène que les autres, ou peut-être même seule active.

Le caractère récent de cette voie de recherche ne nous permet que de donner des résultats encore empreints d'incertitude.

A cette identification du principe actif, se sont surtout opposés des problèmes de purification et d'analyse, en rapports directs avec les très faibles quantités utilisées pour la vaccination : les proportions en contaminants sont de l'ordre de l'incertitude existant sur les mesures.

Un rapport de HOOPS (47), qui consigne tous les travaux réalisés avec la vaccination par les ribosomes de *Salmonella typhimurium*, souligne bien la variabilité des résultats obtenus selon les conditions expérimentales et le mode d'obtention des préparations vaccinales, et par là même, les difficultés d'interprétation de ces résultats (tableau IV).

Il nous a paru, néanmoins, intéressant de citer les grandes hypothèses avancées aujourd'hui, et les travaux qui ont conduit à l'élaboration de ces idées.

S'il est admis par tous que le ribosome possède une activité immunogénique, les avis sont par contre partagés quant à la nature de la fraction immunogène. Certains auteurs attribuent aux protéines ribosomales l'essentiel de l'activité; pour d'autres, ce sont les acides ribonucléiques qui sont actifs; enfin certains chercheurs voient dans les divers contaminants de ces préparations, la véritable portion immunogène des vaccins ribosomaux.

1 - Les protéines ribosomales : fraction immunogène

C'est apparemment l'hypothèse la plus vraisemblable, eu égard à la qualité bien connue des antigènes protéiques. Plusieurs constatations lui ont donné naissance :

- . pour certaines bactéries, des préparations purifiées de protéines ribosomales, se montrent immunogéniques : c'est ce que décrivent WINSTON et BERRY avec *Staphylococcus aureus* (111), SWENDSEN et JOHNSON avec *Streptococcus pneumoniae*

Summary of results with *S. typhimurium* ribosomal vaccines

Type of immunogen	Dose of vaccine (μ g)	Challenge dose (LD ₅₀)	Immune assay	Effective-ness of vaccine (%)	Mouse strain	Reference
RNA	250	5,000	35-day survival	37-52	Ha (ICR)	Bigley ^a & others
RNA-protein	250	5,000	35-day survival	80-90	Outbred	
Protein	100-200	1,000	35-day survival	30-67	Outbred	
Ribosomes	25-200	100	30-day survival	85-100	Swiss Webster	Johnson
Protein	25-200	100	30-day survival	65-100	Outbred	
RNA	200	100	30-day survival	2-5	Outbred	
Ribosomes	25-400	1,000	30-day survival	15-100	Swiss Webster	Johnson ^b
Protein	25-400	1,000	30-day survival	20-100	Outbred	
Protein	25-400	1,000	30-day survival	10-100	Outbred	
Ribosomes	100	25	30-day survival	46	NIH/NMRI	Houchens & Wright ^c
Protein	100	25	30-day survival	25	Outbred	
RNA	100	25	30-day survival	17	Outbred	
RNA (crude) *	6	10,000	30-day survival	94	Albino Swiss	Venneman et al.
RNA ("purified")	10	100+	30-day survival	100	Outbred	
RNA (crude)	44	2.6×10^6 cells	30-day survival	100	Swiss Webster or CD-1	Eisenstein ^d
RNA	50	100	20-day survival	100	A/J inbred	Medina et al. ^e
RNA	50	100,000	20-day survival	0	C57Bl/6J	
RNA (crude ribo-somes)	10	1,000	30-day survival	80	CF-1	This paper ^f
RNA (washed ribo-somes)	50	1,000	30-day survival	20	Outbred	
Protein	9	1,000	30-day survival	90	Outbred	

* Vaccines incorporated in Freund incomplete adjuvant; not used by others.

^a First protein listed extracted with 2-chloroethanol, the second with acetic acid.

^b Route of infection not specified; all others except Vas were intraperitoneally.

^c Route of immunization, intraperitoneal; all others were subcutaneous.

^d Route of infection, intravenous.

^e Protein obtained from salt wash.

TABLEAU IV - Variabilité des résultats obtenus avec *Salmonella typhimurium*.

(93), ainsi que d'autres auteurs avec *Streptococcus pyogenes* (85) et *Vibrio cholerae* (49).

- . L'action protéolytique de la trypsine ou de la pronase (protéase de *Streptomyces griseus* type VI) diminue le pouvoir vaccinant des préparations de ribosomes de *Salmonella typhimurium* ainsi traitées (51), alors que la ribonucléase se montre sans effet dans les mêmes conditions.
- . Le traitement par la chaleur (30' à 60°) élimine le pouvoir immunogénique des ribosomes de *Staphylococcus aureus* (111). Ce test permet de mettre en cause une structure thermolabile, excluant ainsi la possibilité d'un rôle d'éventuels contaminants polysaccharidiques pariétaux (thermostables) (71).

2 - Les acides ribonucléiques : fraction immunogène

Essentiellement soutenue par Youmans et Youmans, cette hypothèse est relative aux nombreux travaux réalisés avec les préparations ribosomales de *Mycobacterium tuberculosis*.

- . La constatation de départ est la perte partielle d'activité de ces préparations après traitement par la ribonucléase, alors que la trypsine, si elle fait disparaître toute trace de protéine, n'affecte en rien le pouvoir vaccinant des préparations ainsi traitées (119). Corrélativement, des préparations purifiées de protéines se montrent inactives (125).
- . Il est ultérieurement souligné, par ces mêmes auteurs, une corrélation étroite entre quantité et qualité des ARN d'une part, et activité immunogénique d'autre part (123) : les préparations les plus efficaces étant celles dans lesquelles l'intégrité de l'ARN est la mieux conservée, notamment en ce qui concerne sa structure bicaténaire (124).
BABA (7) note la même nécessité de structure secondaire pour l'activité de sa préparation ribonucléique de *Pasteurella multocida*.

- . Des travaux réalisés avec d'autres bactéries pathogènes viennent confirmer ou infirmer ces vues

- Avec *Salmonella typhimurium*, des préparations purifiées d'ARN ribosomal sont montrées immunogènes (106, 101).
- Par contre, *Streptococcus pneumoniae* donne des préparations ribonucléiques inefficaces (93).

3 - Les contaminants : fraction immunogène

Selon cette hypothèse, la protection conférée par les vaccins ribosomaux ne serait pas due aux ribosomes eux-mêmes, mais à certains contaminants régulièrement purifiés avec les préparations ribosomales.

Différents types de contaminants sont mis en cause :

- pour HOUCHENS et coll.(48) c'est un mucopolysaccharide ou une glycoprotéine,
- pour HOOPS (47) c'est un lipopolysaccharide ou une endotoxine,
- pour JENSEN et coll.(49) c'est un colloïde d'origine pariétale contenant lipides, protéines et carbohydrates.

EISENSTEIN (36) développe plusieurs arguments, en faveur de cette théorie des contaminants, en prouvant que la protection conférée par les ribosomes de *Salmonella typhimurium* est due aux antigènes O contaminant ces préparations :

- un mutant de *Salmonella typhimurium*, déficient en AgO ne peut donner de préparations ribosomales immunogènes. L'action protectrice des anticorps dirigés contre les antigènes du LPS (lipopolysaccharide) est par ailleurs démontrée (20, 21).

- L'immunogénicité des vaccins n'est pas affectée par une ébullition de 30 minutes, ce qui est compatible avec la stabilité de l'AgO à la chaleur.

BERRY et coll.(12) notent également, par chromatographie en phase gazeuse, la présence de sucres spécifiques de l'AgO dans leurs préparations purifiées d'ARN de *Salmonelles*. Les travaux de O'NEILL (75) confirment, en outre, la forte affinité des lipopolysaccharides pour les acides nucléiques.

4 - Remarques

L'interprétation de tous ces résultats souvent contradictoires s'avère très délicate, d'autant plus que certains des tests de base, servant à l'identification de l'immunogène actif, sont quelquefois controversés, ainsi :

- la ribonucléase ne détruit pas tout l'ARN puisqu'elle épargne les parties bicaténaires (97),
- la pronase ne dégrade pas que les protéines puisqu'elle altère aussi l'ARN (diminution de l'hyperchromicité à 260 nm pendant la dégradation par la ribonucléase) (119).

Pour HOOPS (47) il ne faut pas tenter de rechercher une identité antigénique de tous les vaccins ribosomiaux, qui sont réalisés à partir de bactéries fort différentes, et avec des techniques variées.

5 - Mode d'action des vaccins ribosomiaux

a) Méthodes d'étude

- Les inhibiteurs métaboliques :

Des substances (souvent des antibiotiques) dont le niveau et le mode d'action sont parfaitement connus permettent de bloquer un processus métabolique; l'étude des phénomènes qui en découlent fournit des résultats intéressants. On utilise ainsi :

- . le sulfate de Streptomycine : inhibiteur de la synthèse protéique, principalement chez les bactéries.
- . le Chloramphénicol : inhibiteur de la synthèse protéique dans la cellule bactérienne et la cellule des mammifères.
- . le Cycloheximide : inhibiteur de la synthèse protéique dans les cellules de mammifères.
- . l'Actinomycine D qui bloque la synthèse d'ARN.

- Dosage d'anticorps, étude de l'hypersensibilité immédiate, transferts sériques:

Ce sont des méthodes qui permettent d'évaluer la composante humorale de la réponse immunitaire d'un organisme, à l'introduction d'un antigène.

- Transferts cellulaires, hypersensibilité retardée donnent des renseignements sur les réactions cellulaires opposées à l'antigène étudié.

Ces transferts cellulaires intéressent le plus souvent les lymphocytes spléniques ou les macrophages péritonéaux. Prélevées sur des animaux ayant eu un contact avec l'antigène étudié, les cellules sont, dans de strictes conditions assurant leur survie, transférées à des animaux receveurs dont les réactions seront ensuite testées.

b) Spécificité de la réponse immunitaire

Il semble que la réponse immunitaire induite par les préparations ribosomales soit assez spécifique. Ces vaccins n'assurent, le plus souvent, de protection que contre les bactéries homologues (74,88,29,28). Cependant, il existe quelques cas de protection croisée, mettant donc en cause, soit une réponse non spécifique, soit l'existence d'antigènes communs.

C'est le cas de la protection conférée par les ribosomes de *Klebsiella pneumoniae* contre un challenge de *Streptococcus pneumoniae* (83).

A côté de ce caractère spécifique de la réponse immunitaire, il existe également un aspect non spécifique constaté par YOUNG et YOUNG (126) qui démontrent que les ribosomes de mycobactéries peuvent accroître la réponse de la souris à la γ globuline bovine, dans de grandes proportions.

Ce pouvoir immunostimulant non spécifique est également souligné par GUMBINER et coll. (43) qui induisent une encéphalite allergique avec de l'ARN mycobactérien; il est à mettre en relation avec la propriété bien connue des nucléotides (17) et des ARN (80) d'augmenter la réaction immunitaire. Selon les hypothèses, on accorde ainsi à l'ARN un rôle d'adjuvant pour un contaminant (17) ou pour une protéine (86), cet ARN pourrait, en effet, avoir un rôle de transporteur ("carrier"), ou un rôle structural dans la présentation de l'antigène aux cellules immunocompétentes (111, 5).

c) Nature de la réponse immunitaire

Schématiquement, en se rapportant aux notions classiques, on peut penser qu'il existe deux types possibles de réponse immunitaire : l'une de nature cellulaire, l'autre à médiation humorale.

Les préparations ribosomales sollicitent-elles plus particulièrement la première ?, la seconde ? ou peut-être les deux d'une manière sensiblement équivalente ?

Les transferts permettent d'avancer que les préparations ribosomales ont la possibilité d'induire chacun des types de réponse, et cela, non indifféremment.

- le sérum de souris vaccinées à l'aide de ribosomes ou de protéines ribosomales de *Streptococcus pneumoniae* permet la protection d'animaux receveurs contre une infection virulente de ces bactéries (93).
- les macrophages péritonéaux prélevés sur des souris vaccinées à l'ARN ribosomal de *Salmonelles* protègent les receveurs (103).

Les raisons qui président à la détermination du type de réponse restent, par contre, obscures. Pour VENNEMAN et BERRY (105), la nature de la préparation ribosomale utilisée (ribosome, protéines ou ARN) serait déterminante pour le type d'immunité suscitée.

Pour YOUNG et YOUNG (127) la nature de la réponse serait plutôt liée à l'espèce bactérienne considérée, et cela quelle que soit la préparation envisagée. Cette hypothèse trouve, entre autres, sa vérification pour le pneumocoque (99) auquel s'oppose toujours une réponse de type humoral; pour *Mycobacterium tuberculosis* (56,78) qui provoque une réaction de type cellulaire, et pour *Salmonella typhimurium* induisant une réponse plutôt cellulaire (24,104).

d) Mécanismes intimes

YOUNG et YOUNG (127) distinguent deux sortes de bactéries pour justifier le type d'immunité en cause :

- les germes intracellulaires (dont *M.tuberculosis*) qui stimulent la production d'une immunité purement cellulaire.
- des bactéries considérées comme extracellulaires (*Neisseria*, pneumocoques, *Vibrio cholerae* ...) et pour lesquelles l'immunité passe nécessairement par la production d'anticorps opsonisants (93) facilitant la phagocytose, ou d'anticorps bactéricides (105).

BRAUN et COHEN (18) adaptent la théorie sélective de BURNETT au mode d'action de l'ARN, qui libéré par le macrophage, agirait comme activateur (ou dérégulateur) des cellules souches de populations lymphocytaires produisant des anticorps.

Les inhibiteurs métaboliques ont permis à YOUNG et YOUNG (127) de proposer une théorie originale quant au mécanisme d'action de leur ARN mycobactérien. Ils établissent un parallèle entre la réplication de l'ARN viral oncogénique et l'induction de la réponse immunitaire par l'ARN des mycobactéries; ils émettent alors l'hypothèse que l'induction de la réponse immunitaire chez la souris, passe par la réplication de l'ARN de façon analogue à celle du virus tumoral, l'ARN mycobactérien formerait ainsi, avec l'ADN cellulaire un moule (template) capable de transcrire l'ARN dans la cellule animale, transformant une cellule normale en cellule immunocompétente.

En ce qui concerne le mode d'action des préparations d'ARN sur les tumeurs de souris, on sait seulement, par l'utilisation de souris immunodéprimées, qu'elles mettent en cause une véritable réaction de l'hôte, et pas seulement une action toxique sur les cellules tumorales.

En résumé, de toutes les notions rappelées au cours des trois chapitres précédents, il ressort que :

- le ribosome bactérien, malgré sa complexité est relativement bien connu, tant du point de vue de sa structure que de sa composition chimique exclusivement nucléoprotéique.
- les ribosomes (et préparations dérivées) d'un grand nombre de bactéries possèdent des structures antigéniques particulièrement immunogènes mais dont la nature reste controversée. La seconde partie de cette étude est consacrée à ces problèmes pour deux bactéries (une Gram + et une Gram -).
- le mode d'action de telles substances reste théorique puisqu'on ne sait pas encore avec certitude si c'est la nature de la préparation ribosomale utilisée ou la bactérie qui conditionne le type de réponse immunitaire. Nous rechercherons pour notre part la possibilité de réponse humorale pour les deux bactéries considérées.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE

Nous exposerons, dans cette seconde partie, un travail que nous avons réalisé dans le double but, de confirmer l'efficacité de quelques préparations ribosomales, et d'étudier la composante humorale des mécanismes immunitaires mis en cause lors de la réponse à ce type de vaccin.

Dans un premier chapitre sont réunis les différents matériels et méthodes généralement utilisés pour nos expérimentations. Les détails particuliers, propres à chaque test, figureront avec chacun d'eux dans le chapitre suivant consacré aux protocoles et résultats.

CHAPITRE PREMIER

Matériels

I - Les animaux : Nous avons utilisé la souche Balb/c de souris, entretenue à la Division de Microbiologie du C.R.S.S.A. Les animaux sont pris à l'âge de 5-6 semaines et pèsent alors, en moyenne, 20-25 grammes. Ils sont généralement utilisés par lots de vingt.

II - Les préparations vaccinales : Ce sont des préparations ribosomales qui nous sont fournies sous forme lyophilisée *. Elles sont préparées semi-industriellement selon le procédé de DUSSOURD d'HINTERLAND, NORMIER et DURAND (déjà exposé au cours de l'étude bibliographique : pages 12 et 15).

L'importance quantitative des lots ainsi obtenus nous assure d'une constance de composition et, de la reproductibilité exacte des résultats observés.

Quatre préparations différentes ont été utilisées; ce sont :

- les ribosomes de *Klebsiella pneumoniae*,
- les ribosomes de *Diplococcus pneumoniae*,
- les Acides ribonucléiques purifiés de *Klebsiella pneumoniae*,
- les Acides ribonucléiques purifiés de *Diplococcus pneumoniae*.

* Nous remercions le Centre d'Immunologie et de Biologie Pierre FABRE, 81106 - Castres, de nous avoir gracieusement fourni ces produits.

Elles sont accompagnées d'un excipient essentiellement constitué de mannitol.

L'utilisation de ces préparations se fait par solubilisation extemporanée dans du sérum physiologique.

III - Les bactéries d'épreuve : Afin de réaliser des épreuves (ou challenges) virulentes sur les animaux vaccinés nous avons utilisé les deux souches entretenues au CRSSA et ayant servi à la préparation des ribosomes employés.

- Klebsiella pneumoniae : Entérobactérie, responsable d'infections respiratoires, c'est un gros bacille polymorphe Gram négatif, immobile et capsulé cultivant bien sur milieu Eugon-Broth. La souris y est très sensible, à l'inoculation intrapéritonéale, puisque la mort survient en 24-36 h par septicémie.

- Diplococcus pneumoniae * : Coque allongé Gram positif, disposé par paires, immobile et dont la capsule est constituée d'un mucopolysaccharide spécifique du type. C'est cette capsule qui rend le diplocoque pathogène en provoquant la mort de la souris 24 heures environ après inoculation intra-péritonéale.

Ces souches sont conservées sur souris infectées, tuées à l'éther au moment de la phase de bactériémie et entreposées au congélateur (-30°C).

Méthodes

I - Vaccination des animaux :

Le vaccin lyophilisé est remis en solution dans du sérum physiologique et injecté dans un volume de 0,2 ml par la voie sous-cutanée.

Les travaux de ROBERT (83) nous ont conduit à utiliser la dose de 5 γ de ribosomes, avec rappel 15 jours après; ce protocole conférant une excellente immunité sans, toutefois, induire de phénomènes de tolérance immunitaire.

Après essais préliminaires, la dose de 0,7 γ de préparations ARN fut retenue avec rappel après 15 jours.

* Ce diplocoque, encore dénommé pneumocoque tend à être rattaché, par la taxonomie, au genre des Streptococcus en recevant aussi le nom de Streptococcus pneumoniae.

II - Réalisation des épreuves (tests de protection active) :

Ces épreuves sont réalisées par l'inoculation intrapéritonéale de 0,5 ml d'une suspension infectante de bactéries.

Afin de pouvoir mettre en évidence toute activité protectrice, même discrète, d'une préparation vaccinale, il est nécessaire de doser avec soin ces épreuves. La plus grande sensibilité de ce type de test est obtenue quand la dose infectante est TOUT JUSTE suffisante pour tuer la totalité des animaux témoins. A cette fin, la réalisation d'une épreuve passe par les étapes suivantes :

1 - Obtention d'une suspension quantifiée de bactéries.

- ponction cardiaque, stérile, d'une souris de conservation de la souche, après sa décongélation,
- ensemencement en tube, d'un millilitre de bouillon glucosé tamponné pour *Diplococcus pneumoniae*, ou de bouillon Eugon-Broth pour *Klebsiella pneumoniae*,
- mise en préculture à l'étuve à 37°C pendant 6 heures,
- repiquage sur milieu solide (gélose glucosée tamponnée ou gélose Eugon-Broth) pendant une nuit à l'étuve à 37°C,
- remise en suspension, des colonies qui se sont développées, dans un peu de bouillon,
- numération des bactéries par néphélométrie à 680 nanomètres.
Des manipulations préliminaires ont conduit à estimer à 2.10^7 /ml, dans ces conditions, le nombre de pneumocoques produisant une densité optique de 70 et à 4.10^8 /ml celui de klebsielles produisant une densité optique de 54 *
- A partir de cette suspension mère, réalisation des suspensions désirées par dilution dans du bouillon.

* Mesures réalisées sur Spectrophotomètre JOUAN Junior.

2 - Contrôle de la virulence.

Des différences notables de pathogénicité des souches bactériennes conservées au congélateur, selon les lots, obligent, préalablement à chaque épreuve, à effectuer un contrôle de virulence. On inocule pour cela plusieurs lots de souris avec différentes suspensions de germes (le plus souvent : pur; 10^{-2} par ml; 10^{-4} par ml; 10^{-6} par ml); le dénombrement des survies dans chacun des lots nous conduit à utiliser la suspension pour laquelle la presque totalité des animaux sont morts.

Remarque : Dans certains cas, il pourra être nécessaire de s'approcher davantage de la quantité OPTIMALE de bactéries à administrer; il faudra alors utiliser plusieurs suspensions dans un intervalle plus restreint de concentration (par exemple: 10^{-2} /ml; 5×10^{-3} /ml; 10^{-3} /ml).

Parallèlement à chaque épreuve réalisée, onensemence une boîte de gélose avec la suspension utilisée. Cette boîte, après une nuit à 37°C , servira au contrôle de numération des bactéries.

3 - Lecture des résultats :

Pour les tests d'épreuve, la lecture des résultats se fait par le dénombrement des animaux morts après inoculation, jour après jour jusqu'à stabilisation des résultats et, dans tous les cas, au moins pendant 20 jours.

Il est pratique d'exprimer ces résultats en pourcentage de survie. La comparaison avec le lot témoin permet alors, avec l'aide de tables de distribution binomiale, d'évaluer l'éventuelle significativité des résultats au risque $\alpha = 5\%$ ou au risque $\alpha = 1\%$.

III - Transferts sériques :

- a - Prélèvements : Le prélèvement du sang est effectué selon la méthode décrite par HALPERN (44) : les souris sont anesthésiées à l'éther, et à l'aide d'une pipette Pasteur héparinée, on réalise la ponction du sinus rétro-orbitaire; la saignée est faite le plus complètement possible.

b - Traitement des sérums : Le sang est recueilli dans un tube à centrifugation et laissé 30 minutes à température ambiante afin d'obtenir un début de sédimentation. Une centrifugation modérée (15 mn, 10 000 g) achève la séparation.

Le sérum (environ la moitié du volume sanguin recueilli) est ensuite stérilisé et débarrassé d'éventuelles cellules de la lignée blanche par filtration sur membrane * 0,8 μ .

Le stockage du sérum pour une utilisation précoce est fait à 4°C, et à -20°C pour une utilisation différée de plusieurs jours.

c - Inoculation : Le sérum est injecté par la voie intraveineuse au niveau des veines caudales rendues turgescents par chauffage des souris sous une lampe infra-rouge. La quantité généralement injectée est de 0,2 ml.

IV - Recherche des anticorps ** :

Les anticorps spécifiques sont recherchés par immunoélectrodifusion (technique de LAURELL) :

- Les antigènes (lysats purifiés des bactéries ayant servi à la préparation des ribosomes) sont incorporés à un gel d'aragose à 1% en tampon véronal, pH 8,6.
- Le dépôt des sérums est fait à la cathode.
- La migration des sérums dure 9 heures sous une différence de potentiel de 2,5 volts par cm.
- Après lavage dans du sérum physiologique et de l'eau distillée successivement, et séchage des plaques, il est procédé à une coloration au bleu de Coomassie brillant R et à une décoloration jusqu'à obtenir un fond de plaque transparent.

La hauteur des pics de précipitation (rockets) est fonction de la teneur du sérum en anticorps spécifiques.

* Filtres GELMAN.

** Dosages réalisés par Madame PINEL (Laboratoires Pierre FABRE).

CHAPITRE SECOND

PROTOCOLES ET RESULTATS EXPERIMENTAUX

Dans le but d'étudier quelques aspects de la protection induite par les vaccins ribosomaux, nous avons utilisé les tests classiques de protection active. Dans un premier temps, ce sont les ribosomes eux-mêmes qui ont fait l'objet de nos investigations; puis d'une manière plus prospective nous nous sommes intéressés aux ARN ribosomaux.

A - ETUDE DES RIBOSOMES

A I - Protection active conférée par les ribosomes.

1 - Ribosomes de Klebsiella pneumoniae :

Deux lots de vingt souris, comprenant chacun un nombre égal de mâles et de femelles sont vaccinés à Jo (selon les modalités déjà décrites) avec 5 γ de ribosomes de K.pneumoniae. Quinze jours après (J15) ils reçoivent un rappel dans les mêmes conditions.

- A J21, soit une semaine après le rappel, un des deux lots, ainsi qu'un lot témoin (n'ayant reçu que du sérum physiologique) sont soumis à une épreuve virulente de 1000 klebsielles environ (cf. boîte de contrôle).

- Afin d'étudier une éventuelle protection non spécifique, nous avons fait subir à l'autre lot vacciné (également accompagné d'un lot témoin) une épreuve de 50 Diplocoques.

Les résultats obtenus (consignés dans le tableau V) montrent une protection hautement significative ($\alpha = .1\%$) des souris vaccinées à l'aide de ribosomes de klebsielles contre une épreuve homologue. Cette préparation se montre également très efficace contre une infection à pneumocoques.

Jours	Lot Vacciné	Lot Témoin	Lot Vacciné	Lot Témoin
Jo	5 γ Rib Kp	Sérum φ	5 γ RibKp	Sérum φ
J15	5 γ Rib Kp	Sérum φ	5γ Rib Kp	Sérum φ
J21	Epreuve 1000 K.p.		Epreuve 50 D.p.	
J'o	20	20	20	20
J'1	20	20	20	20
J'2	20 **	8	18	13
J'3	19 **	2	18 *	7
J'4	19 **	1	18 *	7
J'5	19 **	1	18 **	6
J'6	19 **	1	18 **	6
J'7	19 **	1	18 **	5
J'8	18 **	1	18 **	5
J'9	17 **	1	18 **	5
J'10	17 **	1	18 **	5
J'19	17 **	1	18 **	5

** Significativité de 1% de l'écart de mortalité par rapport au témoin.

TABLEAU V - Schéma du protocole et nombre des survies observées avec la vaccination par les ribosomes de Klebsiellles.

2 - Ribosomes de Diplococcus pneumoniae :

La même étude de protection active que précédemment est réalisée en utilisant cette fois, en tant que vaccin, une préparation de ribosomes de *Diplococcus pneumoniae*.

Au vu des résultats, (tableau VI) il y a confirmation de l'activité hautement protectrice ($\alpha = 1\%$) des ribosomes vis-à-vis d'une épreuve de bactéries homologues. On ne retrouve pas, par contre, la protection non spécifique contre une épreuve de klebsielles; seul un léger retard de mortalité semble apparaître, mais en réalité, à aucun moment cette différence n'est statistiquement significative (même au risque de 5%).

A II - Etude des transferts sériques.

Afin d'étudier la composante humorale de la réponse immunitaire, mise en cause dans la protection conférée par les ribosomes, un test de séroprévention est réalisé. Des animaux vaccinés servent de producteurs de sérum pour des animaux receveurs qui seront ensuite éprouvés.

1 - Ribosomes de Diplococcus pneumoniae :

On vaccine 40 souris selon le protocole habituel avec la préparation de ribosomes de *D. pneumoniae*; une semaine après le rappel, les animaux sont saignés; le sérum ainsi recueilli est inoculé par voie veineuse à 20 receveurs, à raison de 0,2 ml par souris.

Un lot de 20 témoins est constitué parallèlement : il reçoit 0,2 ml de sérum provenant d'animaux n'ayant reçu que du sérum physiologique.

Une heure environ après ce transfert sérique, les animaux receveurs sont éprouvés par une suspension de *D. pneumoniae* (400 bactéries). Il a, en effet, été montré (37) que si la demi-vie circulatoire des IgG est de 2 à 5 jours en moyenne chez la souris, elle n'est que de 0,2 à 0,6 j pour les IgM; d'où la nécessité d'effectuer précocement l'épreuve, après l'administration du sérum.

Jours	Lot vacciné	Lot témoin	Lot vacciné	Lot témoin
Jo	5γ RibDp — ↓	Sérum φ — ↓	5γ RibDp — ↓	Sérum φ — ↓
J15	5γ RibDp — ↓	Sérum φ — ↓	5γ RibDp. — ↓	Sérum φ — ↓
J21	Epreuve 50 D.p.		Epreuve 1000 K.p.	
J'o	20	20	20	20
J'1	20	20	20	20
J'2	20	13	12	8
J'3	20 **	7	7	2
J'4	20 **	7	6	1
J'5	20 **	6	6	1
J'6	20 **	6	6	1
J'7	20 **	5	5	1
J'8	20 **	5	4	1
J'9	20 **	5	2	1
J'10	20 **	5	2	1
J'19	20 **	5	2	1

** Significativité de 1% de l'écart de mortalité par rapport au témoin.

TABEAU VI - Schéma du protocole et nombre des survies observées avec la vaccination par les ribosomes de pneumocoques.

Le tableau VII consigne les survies observées parmi les animaux ainsi éprouvés. La haute significativité statistique ($\alpha = 1\%$) de ces résultats met en lumière la présence d'anticorps protecteurs dans le sérum d'animaux vaccinés avec des ribosomes de *D.pneumoniae*, et ce en quantité suffisante pour assurer leur survie.

2 - Ribosomes de Klebsiella pneumoniae :

- Le même transfert sérique est réalisé à partir d'animaux vaccinés avec des ribosomes de *K.pneumoniae*. Une épreuve virulente de ces germes montre l'impossibilité d'obtenir une protection avec 0,2 ml de sérum dans ces conditions (tableau VIII).
- Une manipulation complémentaire reprend le même protocole mais utilise cette fois un transfert de sérum de 1 ml, inoculé aux lots receveurs en deux fois à quelques heures d'intervalle. Les résultats (tableau IX) confirment, dans ces conditions, l'impossibilité d'obtenir un niveau significatif de protection avec les anticorps produits par des animaux vaccinés avec des ribosomes de *K.pneumoniae*.

A III - Cinétique de la réponse humorale aux ribosomes de Diplococcus pneumoniae.

Il a été montré précédemment que l'immunité apportée par la vaccination à l'aide de préparations ribosomales de *Diplococcus pneumoniae*, à l'égard d'une infection homologue, pouvait être transférée par le sérum, mettant ainsi en cause l'existence d'anticorps protecteurs. Ces résultats positifs nous ont conduits à essayer de quantifier la contribution humorale à la protection, au cours de l'élaboration de la réponse immunitaire à ces vaccins.

Une fois de plus nous avons utilisé un test de séroprévention, dans le but de mettre en évidence les anticorps protecteurs.

Parallèlement, en utilisant comme antigènes un lysat bactérien de *Diplococcus pneumoniae* nous avons tenté de doser les anticorps totaux élaborés.

Le principe de cette manipulation est d'évaluer, chez des receveurs, la protection apportée par le sérum d'animaux donneurs vaccinés depuis des délais plus ou moins longs.

Jours	Lot vacciné		Lot témoin	
	Donneurs	Receveurs	Donneurs	Receveurs
Jo	5 γ Rib. D.p.		Sérum ϕ	
J15	5 γ Rib. D.p.		Sérum ϕ	
J21	TRANSFERT 0,2 ml		TRANSFERT 0,2 ml	
J21	Epreuve 400 D. pneumoniae			
J'o		20		20
J'1		19 **		1
J'2		17 **		1
J'3		17 **		1
J'4		17 **		1
J'5		17 **		0
J'19		17 **		0

TABLEAU VII - Schéma du protocole et nombre de survies observées après transfert de 0,2 ml de sérum, avec la vaccination par les ribosomes de D.pneumoniae.

Jours	Lot vacciné		Lot témoin	
	Donneurs	Receveurs	Donneurs	Receveurs
Jo	5γ Rib. K.p.		Sérum ϕ	
J15	5γ Rib. K.p.		Sérum ϕ	
J21	TRANSFERT 0,2 ml		TRANSFERT 0,2 ml	
J21	Epreuve 1000 K.pneumoniae			
J'o		20		20
J'1		12		11
J'2		5		2
J'3		4		2
J'4		4		2
J'5		2		2
J'6		1		2
J'19		1		2

TABLEAU VIII - Schéma du protocole et nombre des survies observées après transfert de 0,2 ml de sérum avec la vaccination par les ribosomes de K.pneumoniae.

Jours	Lot vacciné		Lot témoin	
	Donneurs	Receveurs	Donneurs	Receveurs
	5 γ Rib. K.p.		Sérum ϕ	
Jo				
J15	5 γ Rib. K.p.		Sérum ϕ	
J21	TRANSFERT 1 ml		TRANSFERT 1 ml	
J21	Epreuve 700 K. pneumoniae			
J ₀	20		20	
J'1	20		20	
J'2	12		7	
J'3	3		1	
	3		1	
J'19	3		1	

TABEAU IX - Schéma du protocole et nombre des survies observées après transfert de 1 ml de sérum, avec la vaccination par les ribosomes de K.pneumoniae.

Le protocole habituel de vaccination est quelque peu modifié puisque, afin de bien situer dans le temps le contact antigénique, les animaux donneurs de sérum ne reçoivent qu'une seule sollicitation vaccinale (qui est pour cette raison doublée et donc de 10 γ).

Quatre lots de 20 souris (I, II, III, IV) respectivement vaccinés depuis 2 jours, 5 jours, 10 jours, 30 jours, à l'aide d'une injection unique de 10 γ de ribosomes de *D. pneumoniae*, sont sacrifiés et servent de donneurs de sérum pour huit lots receveurs de 15 souris (à raison de 0,2 ml par animal). Le sérum de chaque lot donneur (obtenu par la réunion en "pool" du sérum des 20 animaux) sert en effet à réinoculer deux lots receveurs (a et b) dont l'un (a) sera éprouvé immédiatement et l'autre (b) vingt jours plus tard.

L'organigramme (tableau X) expose ce protocole qui nécessite plusieurs épreuves et autant de lots témoins; pour des raisons de commodité et de rigueur, ce protocole est modifié pour être adapté à la réalisation pratique et peut alors se schématiser comme le représente le tableau XI.

Remarque : juste avant chaque épreuve, cinq animaux (parmi les quinze de chacun des lots receveurs de sérum) sont sacrifiés et saignés; leur sérum réuni en pool est conservé à des fins d'analyse (il reçoit le numéro d'ordre du lot dont il provient : Ia, Ib, IIa, IIb....etc). Les dix animaux restants dans chaque lot sont, eux, soumis à l'épreuve virulente.

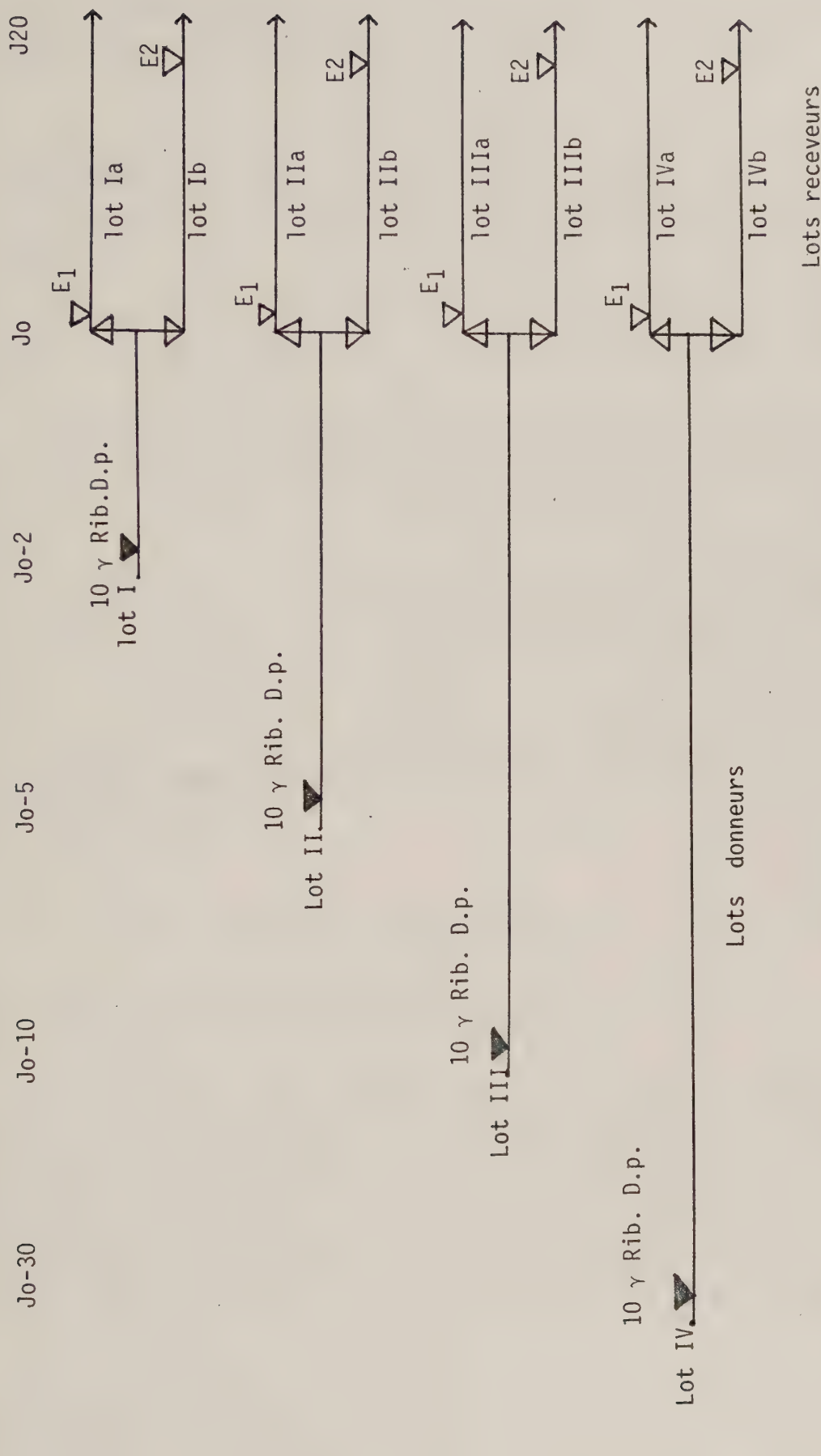


TABLEAU XI - Organigramme du protocole de réalisation pratique.

Le tableau ci-dessous consigne les survies observées pour chaque lot de 10 animaux, vingt jours après chacune des deux épreuves réalisées.

Lots donneurs	I		II		III		IV		Témoin
Lots receveurs	Ia	Ib	IIa	IIb	IIIa	IIIb	IVa	IVb	
Epreuve Jo	0		4		6		6		1
Epreuve J20		1		0		0		0	0

L'épreuve réalisée à Jo, c'est-à-dire immédiatement après le transfert sérique, fait apparaître un début de protection au 5ème jour. Cette protection s'affirme au 10ème jour et reste importante au 30ème jour.

Le défaut de survie enregistré à la suite de la seconde épreuve (J20) sur les lots (Ib, IIb, IIIb, IVb) atteste de la décroissance des immunoglobulines chez les animaux receveurs et sert ainsi de témoin négatif de la manipulation.

Le dosage des anticorps antiribosomes par immunoélectrodifusion ne nous a fourni que fort peu de résultats puisque seuls les sérums des lots III et IV se sont montrés positifs.

B - ETUDE DES ARN RIBOSOMAux

B I - Protection active conférée par les ARN.

La capacité des ARN ribosomiaux à induire une immunité protectrice, vis-à-vis d'une infection expérimentale, a été étudiée comme pour les ribosomes entiers. Toutefois, la dose vaccinnante utilisée a été fixée à 0,7 γ d'ARN (pour des raisons de commodité et après essais préliminaires). Une éventuelle protection non spécifique a également été envisagée en faisant subir aux animaux vaccinés, outre une épreuve de germes homologues, une infection de bactéries différentes.

1 - ARN ribosomal de Klebsiella pneumoniae :

- Une épreuve de 2000 klebsielles réalisée sur un lot de 20 souris vaccinées et sur un lot témoin révèle une haute activité protectrice de ces préparations à l'égard d'une épreuve homologue (tableau XII).
- Une épreuve hétérologue (10 diplocoques) ne fait apparaître, par contre, aucune différence entre le lot vacciné et le lot témoin (tableau XII).

2 - ARN ribosomal de Diplococcus pneumoniae :

- La vaccination, dans les conditions habituelles, d'animaux à l'aide d'ARN ribosomal de diplocoques protège très significativement ($\alpha = 1\%$) contre une épreuve de 10 D.pneumoniae mais se montre totalement inefficace contre une épreuve de klebsielles (tableau XIII).

B II - Etude des transferts sériques.

Nous avons, sur le même plan et par les mêmes méthodes que pour les ribosomes (paragraphe II), étudié la composante humorale mise en cause dans la protection conférée par les ARN.

1 - Vaccination avec les ARN de klebsielles :

Quarante souris vaccinées avec les ARN de K.pneumoniae servent de producteurs de sérum pour vingt souris qui en reçoivent chacune 0,2 ml.

Une épreuve de klebsielles met en évidence un écart significatif ($\alpha = 1\%$) de mortalité entre ce lot receveur et un lot témoin constitué comme précédemment (tableau XIV).

2 - Vaccination avec les ARN de pneumocoques :

Quarante souris sont également vaccinées avec les ARN de D.pneumoniae et servent de donneurs de sérum pour vingt animaux receveurs.

Le tableau XV consigne les résultats d'une épreuve intéressant ce lot receveur de sérum ainsi qu'un lot témoin. Ici encore l'écart de mortalité est statistiquement significatif ($\alpha = 5\%$).

Jours	Lot vacciné	Lot témoin	Lot vacciné	Lot témoin
Jo	0,7 γ ARN K.p.	Sérum φ	0,7 γ ARN K.p.	Sérum φ
J15	0,7 γ ARN K.p.	Sérum φ	0,7 γ ARN K.p.	Sérum φ
J21	Epreuve 2000 K.p.		Epreuve 10 D.p.	
J'o	20	20	20	20
J'1	20	20	20	20
J'2	20 **	4	0	0
J'3	20 **	1	0	0
	18 **	1		
	18 **	1		
J'19	18 **	1	0	0

TABLEAU XII - Schéma du protocole et nombre des survies observées
avec la vaccination par les ARN de *Klebsiella pneumoniae*.

Jours	Lot vacciné	Lot témoin	Lot vacciné	Lot témoin
Jo	0,7 γ ARN D.p	Sérum φ	0,7 γ ARN D.p	Sérum φ
J15	0,7 γ ARN D.p	Sérum φ	0,7 γ ARN D.p	Sérum φ
J21	Epreuve 10 D.p.		Epreuve 10 000 K.p.	
J'o	20	20	20	20
J'1	20	20	16	18
J'2	20 **	0	3	5
J'3	"	"	1	1
J'4	"	"	1	1
J'5	"		0	1
J'6				
J'19	20 **	0	0	1 0

TABEAU XIII - Schéma du protocole et nombre de survies observées avec la vaccination par les ARN de *Diplococcus pneumoniae*.

Jours	Lot vacciné		Lot témoin	
	Donneurs	Receveurs	Donneurs	Receveurs
Jo	0,7 γ ARN K.p		Sérum φ	
J15	0,7 γ ARN K.p		Sérum φ	
J21	TRANSFERT 0,2 ml		TRANSFERT 0,2 ml	
J21	Epreuve 1000 Klebsiella pneumoniae			
J'o		20		20
J'1		20		20
J'2		20		16
J'3		19 **		4
J'4		18 **		2
		17 **		
		14 **		
		13 *		
J'19		13 *		2

TABLEAU XIV - Schéma du protocole et nombre des survies observées après transfert de 0,2 ml de sérum, avec la vaccination par les ARN de Klebsiella pneumoniae.

Jours	Lot vacciné		Lot témoin	
	Donneurs	Receveurs	Donneurs	Receveurs
Jo	0,7 γ ARN D.p		Sérum φ	
J15	0,7 γ ARN D.p		Sérum φ	
J21	TRANSFERT 0,2 ml		TRANSFERT 0,2 ml	
J21	EPREUVE 100 Diplococcus pneumoniae			
J'o		20		20
J'1		20		20
J'2		20		20
J'3		20		14
J'4		20 *		12
				11
J'19		20 *		11

TABLEAU XV - Schéma du protocole et nombre des survies observées après transfert de 0,2 ml de sérum, avec la vaccination par les ARN de *Diplococcus pneumoniae*.

TROISIEME PARTIE

DISCUSSION ET CONCLUSION

DISCUSSION

De multiples travaux se sont, depuis 1965, accordés à montrer que les préparations ribosomales de certaines bactéries, pouvaient être à l'origine d'une protection, plus ou moins spécifique, contre une infection expérimentale. Néanmoins, la variabilité des techniques de préparation de ces substances, et le large éventail des bactéries étudiées ont conduit à des résultats sensiblement différents, donc à des interprétations quelquefois divergentes de leur mode d'action.

Disposant de préparations ribosomales de deux bactéries (*Klebsiella pneumoniae* et *Diplococcus pneumoniae*) ainsi que de préparations d'acides ribonucléiques ribosomaux de ces mêmes bactéries, il nous a paru intéressant d'en rechercher l'efficacité chez la souris Balb/c, et dans l'affirmative, d'en étudier le mode d'action.

Dans une première série d'expériences, nous nous sommes proposés, afin d'évaluer l'EFFICACITE de nos préparations, d'étudier la protection conférée chez la souris par deux injections sous-cutanées (à 15 jours d'intervalle) de préparation de ribosome total, sans adjonction d'adjuvant, contre une infection homologue.

La haute significativité ($\alpha = 1\%$) des résultats obtenus pour *D.pneumoniae* comme pour *K.pneumoniae*, démontre le grand pouvoir immunogène des préparations de ribosome total, même à de très faibles doses (5 microgrammes). Ces résultats sont en accord avec les travaux de ROBERT (83) qui obtient une protection significative chez la souris avec 2 μg d'un mélange de ribosomes bactériens.

Une éventuelle protection non spécifique a également été envisagée, au cours de cette manipulation, en réalisant des épreuves croisées (épreuve *D.pneumoniae* sur animaux vaccinés avec des ribosomes de *K.pneumoniae*, et réciproquement). Ces challenges ont révélé que les ribosomes de *Diplococcus pneumoniae* n'avaient aucune activité vis-à-vis d'une épreuve par *Klebsiella pneumoniae*, soulignant, comme le fait le plus souvent la littérature, une spécificité d'action de ce type

de vaccin. Cependant, des préparations de ribosomes de *K.pneumoniae* protègent très significativement ($\alpha = 1\%$) contre une épreuve par *D.pneumoniae*. On peut penser que cette réponse non spécifique est due soit à l'existence de déterminants antigéniques communs à *D.p* et à *K.p* - solution qui n'est pas à écarter, mais qui est peu probable puisque l'on ne constate pas de réciprocité à ces phénomènes - soit à la capacité intrinsèque des préparations ribosomales de *K.p* de stimuler le système immunitaire d'une manière non spécifique : augmentation de la phagocytose (macrophages), libération de sécrétions non spécifiques (L.A.F: Lymphocyte activating factor; M.I.F: Mobility Inhibiting factor; M.A.F: Macrophage activating factor etc...). Cette dernière hypothèse semble la plus vraisemblable si on se réfère aux travaux de YOUNG et YOUNG (126) qui montrent bien que les ribosomes de mycobactéries sont capables d'accroître la réponse de souris à la sérum albumine bovine. De même GUMBINER et coll.(43) induisent une encéphalite allergique autoimmune avec les mêmes ribosomes. Cependant, si on utilise (expériences en cours) des préparations ribosomales lavées au chlorure d'ammonium 1 M, on ne retrouve pas cette protection hétérologue. Il est donc logique de penser à la présence d'un contaminant éventuel.

Cette contamination, possible au cours des différentes opérations de purification est du reste fréquemment dénoncée dans la littérature. On sait, en effet, que le peptidoglycane des bactéries Gram négatif - polymère assurant la rigidité de la paroi - est doué de propriétés immunostimulantes. NAKASHIMA (72,73) montre qu'il en est de même pour les lipopolysaccharides (LPS) de *Klebsiella* qui se révèlent mitogènes in vitro.

Au cours de travaux récents CONTENT (27) a, par ailleurs, montré par la méthode des plages de lyse, un effet immunostimulant d'un mélange de ribosomes et d'extraits membranaires de *Klebsiella*.

Des différences dans la nature et les propriétés pariétales des deux bactéries considérées - pneumocoque GRAM positif et *klebsielle* GRAM négatif - pourraient ainsi expliquer des comportements différents du système immunitaire vis-à-vis des deux préparations utilisées.

L'étude de la susceptibilité d'animaux, recevant l'une ou l'autre de nos préparations, vis-à-vis d'une infection virale (grippe par exemple) pourrait permettre de tirer des conclusions générales sur la protection non spécifique que peuvent apporter ces vaccins.

Ces hypothèses nous conduisent au problème essentiel, à savoir pourquoi les ribosomes sont capables d'induire une protection. Nous venons d'évoquer la possibilité que des fractions antigéniques, normalement présentes à la surface de la bactérie puissent s'adsorber sur le ribosome lors de sa préparation. La substance immunogène responsable de la protection, contaminant les ribosomes pourrait donc être efficace, d'après nos résultats, à des doses très faibles, inférieures au microgramme.

On peut également se demander, devant les résultats de certains auteurs rattachant le pouvoir protecteur des ribosomes à leur composante protéique, dans quelle mesure les néoprotéines en voie de synthèse, fixées sur les ribosomes, ne sont pas responsables de tout ou partie de cette protection.

Il est logique de penser que certaines de ces protéines sont destinées au maintien de la structure de la paroi bactérienne. Dans ce dernier cas, les protéines constituées du ribosome ne joueraient qu'un rôle mineur, voir même nul, dans l'acquisition de la protection. Ici encore, la notion de "contaminant" ressort.

Dans une seconde série d'expériences nous avons cherché à dissocier la réponse humorale de la réponse cellulaire, par l'étude des transferts de sérum d'animal vacciné à animal non vacciné. L'épreuve est réalisée immédiatement après le transfert sérique, dans le double but d'éviter la dégradation des immunoglobulines transférées, chez le receveur, et afin de négliger l'action que pourraient avoir d'éventuels antigènes ribosomaux qui seraient inoculés au receveur à la faveur du transfert de sérum.

On constate, dans les conditions de l'expérience, que seuls les ribosomes de *Diplococcus pneumoniae* peuvent, par le sérum transféré, assurer (très significativement) la survie des receveurs contre une épreuve homologue. Une quantité, même cinq fois supérieure, de sérum provenant d'animaux vaccinés avec des ribosomes de klebsielles, n'apporte aucune protection contre une épreuve de cette même bactérie. Ces faits laissent à penser, comme le suggèrent THOMPSON et EISENSTEIN (99) que l'immunité suscitée par les préparations ribosomales de pneumocoques, ainsi que toute fraction immunigène isolée de cette bactérie, d'ailleurs, serait essentiellement d'origine humorale et donc due à la formation d'anticorps spécifiques circulants. Un autre type d'immunité pourrait donc, au contraire, être envisagé

pour *Klebsiella pneumoniae*. L'étude des transferts cellulaires (cellules spléniques et macrophages péritonéaux) a effectivement conduit notre Laboratoire, à obtenir des résultats positifs.

Afin de confirmer les résultats de séroprotection obtenus avec les préparations de diplocoques, il nous a paru intéressant d'essayer de mettre en parallèle l'évolution du taux des anticorps spécifiques du sérum d'animaux après vaccination et la protection que ce sérum pouvait conférer aux receveurs. Pour bien situer dans le temps le contact antigénique, les animaux n'ont pas reçu d'injection de rappel. La réponse immunitaire, dans ce cas, est donc plus le fait des IgM que des IgG. Le protocole que nous avons choisi possède ainsi l'avantage d'entraîner, chez les vaccinés, une variation rapide et d'intensité relativement grande du taux des anticorps, et par conséquent de faciliter l'étude cinétique de la protection apportée aux receveurs. Cette protection qui semble apparaître dès le 5ème jour, mais qui n'est significative qu'au 10ème jour se conserve à un bon niveau jusqu'au 30ème jour. Elle est par conséquent tout à fait compatible avec une cinétique d'apparition d'anticorps. Malheureusement, au cours de ce travail exploratoire il n'a pas été possible de relier protection et concentration en anticorps des sérums. La technique de LAURELL (qui ne permet de mettre en évidence que les anticorps précipitants) se révèle être, en effet, peu sensible lorsque l'on utilise, à titre d'antigène, un lysat bactérien.

Une dernière série d'expériences a eu pour but de rechercher, d'une part, l'efficacité de préparations purifiées d'acides ribonucléiques des deux bactéries étudiées, d'autre part, l'éventuelle possibilité de transférer cette protection par le sérum.

De même que la préparation de ribosomes totaux, l'ARN ribosomal de diplocoque se montre particulièrement actif ($\alpha = 1\%$) contre une infection homologue, mais est dénué d'efficacité vis-à-vis de *K.pneumoniae*. Les transferts sériques ont également apporté la preuve que la protection était à médiation humorale.

Le pouvoir vaccinant de l'ARN ribosomal de klebsielles contre une épreuve homologue est également caractéristique, mais on ne retrouve pas, par contre, cette protection si le challenge est effectué avec *D.pneumoniae*.

Il ne semble pas qu'il faille rapporter la perte du pouvoir immunostimulant, observé avec le ribosome entier, à la disparition des protéines ribosomales, car si les protéines se révèlent de bons antigènes elles ne sont pas réputées pour être douées de propriétés immunostimulantes.

Il semble plus logique d'admettre, qu'au cours des nombreuses étapes de purification qui conduisent du ribosome à l'ARN ribosomal, tout ou partie des polysaccharides ou lipopolysaccharides de contamination ont été éliminés.

Les transferts de sérum, alors qu'ils n'assuraient aucune protection avec les préparations de ribosome entier de klebsielle, conduisent paradoxalement à un taux significatif de protection quand il s'agit des ARN.

On peut donc supposer, pour interpréter ces phénomènes, que dans le ribosome les protéines de klebsielle peuvent masquer les sites immunogènes aux cellules chargées de les reconnaître. Devant la complexité de tels phénomènes, nous sommes obligés d'admettre que les différentes fractions extraites d'une même bactérie n'induisent pas toutes le même type de réaction immunitaire. C'est ce que suggère, d'ailleurs, VENNEMAN (104) pour *Salmonella typhimurium*.

Au cours de cette discussion, nous avons essayé d'interpréter nos résultats expérimentaux d'après les hypothèses les plus couramment admises. Il apparaît qu'il serait vain, néanmoins, de trop vouloir schématiser ou de chercher à généraliser des résultats qui ont été obtenus avec *Diplococcus pneumoniae* ou *Klebsiella pneumoniae*, des techniques de purification et une méthodologie particulières. Parallèlement à la recherche de l'efficacité de ces préparations, une étude chimique analytique précise devrait nous permettre de connaître le rôle exact des contaminants.

CONCLUSION

Une protection spécifique a pu être obtenue chez la souris Balb/c, contre deux bactéries pathogènes pour cette espèce (*Streptococcus pneumoniae* et *Klebsiella pneumoniae*), à l'aide d'injections sous-cutanées, d'extraits ribosomaux totaux ou d'ARN ribosomaux, sans adjuvant et à des doses voisines du microgramme.

Des tests de séroprotection ont permis de dégager un mécanisme de défense humoral.
Une meilleure compréhension du mode d'action de ces substances pourrait être apportée par l'utilisation de transferts cellulaires.

Vu :
P. O. , LE DIRECTEUR
de l'École Nationale Vétérinaire de Lyon,
le professeur Delafosse.

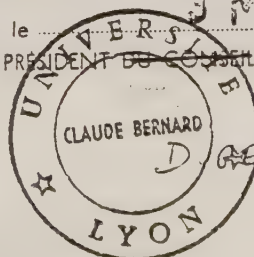
Vu :
~~LE DOYEN,~~

LE PROFESSEUR RESPONSABLE
de l'École Nationale Vétérinaire,

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE,

Vu et permis d'imprimer

LYON, le 3 MAI 1978
LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ



LYON I

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - ACTOR P., PITKIN D., JENSEN R. - Cholera immunity : characterization of subunit antigens isolated from *Vibrio cholerae* ribosomal preparations.
- The immune system and infectious diseases, 4 th Int. Convoc. Immunol. Buffalo, N.Y. (Karger Basel, 1975), 1974, (411-422).
- 2 - AGARWAL S.C., SUNDARARAJ T. - Cell-mediated immunity to *Vibrio cholerae* with ribonucleic acid-protein fractions of *V.cholerae* L-form lysates.
- Infect. Immun., 1976, 14, (363-367).
- 3 - AGARWAL S.C., SUNDARARAJ T. - Cell mediated immunity after oral immunization with ribonucleic acid-protein fractions of *Vibrio cholerae* L-form lysates.
- Infect. Immun., 1977, 16, (527-530).
- 4 - ANDRON L.A., II, EIGELSBACH H.T. - Effect of RNA-rich bacterial extracts on resistance of mice to tularemia.
- Abstr. 74 th Ann.Meet.Amer.Soc.Microbiol., Chicago, 1974, pp.117 M 307.
- 5 - ANDRON L.A., II, EIGELSBACH H.T. - Biochemical and immunological properties of ribonucleic acid-rich extracts from *Francisella tularensis*.
- Infect. Immun., 1975, 12, (137-142).
- 6 - ARAUJO F.G., REMINGTON J.S. - Protection against *Toxoplasma gondii* in mice immunized with toxoplasma cell fractions, RNA and synthetic polyribonucleotides.
- Immunol., 1974, 27, (711-721).
- 7 - BABA T. - Immunogenic activity of a ribosomal fraction obtained from *Pasteurella multocida*.
- Infect. Immun., 1977, 15, (1-6).
- 8 - BAKER R.E., HILL W.E., LARSON C.L. - Delayed hypersensitivity reactions provoked by ribosomes from acid-fast bacilli. - I - Ribosomal isolation, characterization, delayed hypersensitivity and specificity.
- Infect. Immun., 1972, 6, (258-265).
- 9 - BAKER R.E., HILL W.E., LARSON C.L. - Ribosomes of acid-fast bacilli : immunogenicity, serology, and in vitro correlates of delayed hypersensitivity.
- Infect. Immun., 1973, 8, (236-244).
- 10 - BEHRENS M. - Ueber die Lokalisation der Hefenucleinsäure in pflanzlichen Zellen.
- Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem., 1938, 253, (185).
- 11 - BERRY L.J. - Effect of malonate on growth rate of *Salmonella typhimurium* in mice.
- Ann. N.Y. Acad. Sci., 1955, 62, (327-348).

- 12 - BERRY L.J., DOUGLAS G.N., HOOPS P., PRATHER N.E. - The background of immunization against Salmonellosis.
- In E. Neter and Malmgren (Ed.), Proceedings of the Fourth International Convocation on Immunology. Karger Basel, 1975, pp.388-398.
- 13 - BOSCH L. - The mechanism of protein synthesis and its regulation.
- BOSCH L. ed. North Holland, Amsterdam, 1972.
- 14 - BRACHET J. - Recherches sur la synthèse de l'acide thymonucléique pendant le développement de l'oeuf d'oursin.
- Arch. Biol., 1933, 44, (519).
- 15 - BRACHET J. - La détection histochimique des acides pentosenucléiques.
- C.R. Soc. Biol., 1940, 133, (88).
- 16 - BRANLANT C., KROL A., SRIWIDADA J., FELLNER P., CRICHTON R. - The identification of the RNA binding sites for a 50 S ribosomal protein by a new technic.
- FEBS Letters, 1973, 35, (265).
- 17 - BRAUN W., FIRSHEIM W. - Biodynamic effects of oligonucleotides.
- Bacteriol. Rev., 1967, 31, (83-94).
- 18 - BRAUN W., COHEN E.P. - On the role of nucleic acids in antibody formation.
- B. Cinader (ed.), Regulation of the antibody response
Charles C. Thomas, Publishers, Springfield III, 1968, (349-362).
- 19 - BROWNLEE G.G., SANGER F., BARRELL B.G. - The sequence of 5S rRNA.
- J. Mol. Biol., 1968, 34, (379).
- 20 - Mc CABE W.R. - Immunization with R mutants of S.minnesota. I Protection against challenge with heterologous gram negative bacilli.
- J. Immunol., 1972, 108, (601-610).
- 21 - Mc CABE W.R., KREGER B.E., JOHNS M. - Type specific and cross reactive antibodies in gram negative bacteremia.
- N. Engl. J. Med., 1972, 287, (261-267).
- 22 - CASPERSSON T. - II Methods for the determination of the absorption spectra of cell structures.
- J. Roy. Microscop. Soc., 1940, 60, (8).
- 23 - CLAUDE A. - A fraction from normal chick embryo similar to the tumor producing fraction of chicken tumor.
- I. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1938, 39, (1).
- 24 - COLLINS F.M., MACKANESS G.B., BLANDEN R.V. - Infection immunity in experimental salmonellosis.
- J. Exp. Med., 1966, 124, (601-619).
- 25 - COLLINS F.M. - Effect of specific immune mouse serum on the growth of Salmonella enteritidis in mice pre immunized with living or ethylalcohol-killed vaccines.
- J. Bacteriol., 1969, 97, (676-683).

- 26 - COLLINS F.M. - Mechanisms in antimicrobial immunity.
- J. Reticuloendothel. Soc., 1971, 10, (58-99).
- 27 - CONTENT Y. - Contribution à l'étude de l'immunostimulation non spécifique à l'aide d'extraits bactériens.
- Thèse de Doctorat Vétérinaire, LYON, 1976.
- 28 - COPPEL S., YOUMANS G.P. - Specificity of acquired resistance produced by immunization with mycobacterial cells and mycobacterial fractions.
- J. Bacteriol., 1969, 97, (114-120).
- 29 - COPPEL S., YOUMANS G.P. - Specificity of acquired resistance produced by immunization with *Listeria monocytogenes* and *Listeria* fractions.
- J. Bacteriol., 1969, 97, (121-126).
- 30 - CORBEL M.J. - The immunogenic activity of ribosomal fractions derived from *Brucella abortus*.
- J. Hyg., 1976, 76, (65-74).
- 31 - COX R. - The use^{of} guanidinium chloride in the isolation of nucleic acids.
- M.L. Grossman and K. Moldave (ed.) Methods in enzymology, Vol. 12, Academic Press Inc, New York, 1968, pp. 120-128.
- 32 - CRESTFIELD A.M., SMITH K.C., ALLEN F.W. - The preparation and characterization of ribonucleic acids from yeast.
- J. Biol. Chem., 1955, 216, (185-193).
- 33 - DUSSOURD D'HINTERLAND L., SERRE H., NORMIER G. - Préparation de vaccins à base de fractions ribosomales antigéniques.
- Brevet d'invention n° 73-43957 du 10-12-1973.
- 34 - EHRESMANN C., STIEGLER P., FELLNER P., EBEL J.P. - The determination of the primary structure of the 16S ribosomal RNA of *Escherichia coli*.
II - Nucleotide sequences of products from partial enzymatic hydrolysis.
- Biochimie, 1972, 54, (901).
- 35 - EISENSTEIN T.K., WINSTON S.H., BERRY L.J. - Ribosomal extracts as protective antigens against *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* infections.
- Bacteriol. Proc., 1968, 68, (87).
- 36 - EISENSTEIN T.K. - Evidence for O antigens as the antigenic determinants in "ribosomal" vaccines prepared from *Salmonella*.
- Infect. Immun., 1975, 12, (364-377).
- 37 - FAHEY J.L., SELL S. - The immunoglobulins of mice. The metabolic (catabolic) properties of five immunoglobulin classes.
- J. Exp. Med., 1965, 122, (41).
- 38 - FEIT C., TEWARI R.P. - Immunogenicity of ribosomal preparations from yeast cells of *Histoplasma capsulatum*.
- Infect. Immun., 1974, 10, (1091-1097).
- 39 - FOGEL S., SYMPHERD P.S. - Extraction and isolation of individual ribosomal proteins from *Escherichia coli*.
- J. Bacteriol., 1968, 96, (358-364).

- 40 - FRAENKEL-CONRAT H. - Degradation of tobacco mosaic virus with acetic-acid.
- Virology, 1957, 4, (1).
- 41 - GRIERER A., SCHRAMM G. - Infectivity of ribonucleic acid from tobacco mosaic virus.
- Nature (London), 1956, 177, (702-703).
- 42 - GUENTZEL M.N., BERRY L.J. - Protection of suckling mice from experimental cholera by maternal immunization : Comparison of the efficacy of whole cell, ribosomal derived, and enterotoxin immunogens.
- Infect. Immun., 1974, 10, (167-172).
- 43 - GUMBINER C., PATERSON P.Y., YOUMANS G.P., YOUMANS A.S. - Adjuvancity of mycobacterial RNA and poly A:U for induction of experimental allergic encephalomyelitis in guinea-pigs.
- J. Immunol., 1973, 110, (309-312).
- 44 - HALPERN B.N., PACAUD A. - Technique de prélèvement d'échantillons de sang chez les petits animaux de laboratoire par ponction du plexus ophtalmique.
- C.R. Biol., Paris, 1951, 145, (1465-1466).
- 45 - HARDY S.J.S., KURLAND C.G., VOYNOW P. MORA G. - The ribosomal proteins of Escherichia coli. I Purification of the 30S ribosomal proteins.
- Biochemistry, 1969, 8, (2897).
- 46 - HASELKORN R., ROTHMAN-DENES L.B. - Protein synthesis.
- Ann. Rev. Biochem., 1973, 42, (397).
- 47 - HOOPS P., PRATHER N.E., BERRY L.J., RAVEL J.M. - Evidence for an extrinsec immunogen in effective ribosomal vaccines from Salmonella typhimurium.
- Infect. Immun., 1976, 13, (1184-1192).
- 48 - HOUCHENS D.P., WRIGHT G.L. Jr. - Immunity to Salmonella typhimurium infection. Characterization of antigens in active protection by polyacrylamide gel electrophoresis.
- Infect. Immun., 1973, 7, (507-511).
- 49 - JENSEN R., GREGORY B., NAYLOR J., ACTOR P. - Isolation of protective somatic antigen from Vibrio cholerae (Ogawa) ribosomal preparation.
- Infect. Immun., 1972, 6, (156-161).
- 50 - JOHNSON W., SURGALLA M.J. - Studies of ribosomal antigens from Pasteurella pestis.
- Bact. Proc., 1970, 8, (112).
- 51 - JOHNSON W. - Ribosomal vaccines. I - Immunogenicity of ribosomal fractions isolated from Salmonella typhimurium and Yersinia pestis.
- Infect. Immun., 1972, 5, (947-952).
- 52 - JOHNSON W. - Ribosomal vaccines. II - Specificity of the immune response to ribosomal ribonucleic acid and protein isolated from Salmonella typhimurium.
- Infect. Immun., 1973, 8, (395-400).

- 53 - KALTSCHMIDT E., WITTMANN H.G. - Ribosomal proteins. XXXII - Comparison of several extraction. Methods for proteins from *Escherichia coli*.
- *Biochimie*, 1972, 54, (167).
- 54 - KANAI K., YOUMANS G.P. - Immunogenicity of intracellular particles and cell walls from *Mycobacterium tuberculosis*.
- *J. Bacteriol.*, 1960, 80, (607-614).
- 55 - KIRBY K.S. - A new method for isolation of ribonucleic acid from mammalian tissues.
- *Biochem. J.*, 1956, 64, (405-408).
- 56 - KLUN C.L., YOUMANS G.P. - The effect of lymphocyte supernatant-fluids on the intracellular growth of virulent tubercule bacilli.
- *J. Reticuloendothel. Soc.*, 1973, 13, (263-274).
- 57 - KURLAND C.G. - The requirements for specific sRNA binding by ribosomes.
- *J. Mol. Biol.*, 1966, 18, (90-108).
- 58 - LERMAN M.I., SPIRIN A.S., GAVRILOVA L.P., COLON F.V. - Studies on the structure of ribosomes. II - Stepwise dissociation of protein from ribosomes by caesium chloride and reassembly of ribosome-like particles.
- *J. Mol. Biol.*, 1966, 15, (268).
- 59 - LIEBERMAN M.M. - Direct evidence for the presence of lipopolysaccharide components in a *pseudomonas* ribosomal vaccine.
- *Infect. Immun.*, 1977, 17, (471-473).
- 60 - LITTLEFIELD J.W., KELLER E.B., GROS J., ZAMECNIK P.C. - Studies on cytoplasmic ribonucleoprotein particles from the liver of the rat.
- *J. Biol. Chem.*, 1955, 217, (111).
- 61 - LOGE R.V., HILL W.E., BAKER R.E., LARSON C.L. - Delayed hypersensitivity reactions provoked by ribosomes from acid-fast bacilli : physical characteristics and immunological aspects of core ribosomal proteins from *Mycobacterium smegmatis*.
- *Infect. Immun.*, 1974, 9, (489-496).
- 62 - LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. - Protein measurment with the folin phenol reagent.
- *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, (265-275).
- 63 - LUSENA C.V. -
- *Can. J. Biochem.*, 1951, 29, (107-108).
- 64 - LYNN M., TEWARI R.P., SOLOTOROVSKY M. - Immunoprotective activity of ribosomes from *Haemophilus influenzae*.
- *Infect. Immun.*, 1977, 15, (453-460).
- 65 - MARGOLIS J.M., BIGLEY N.J. - Cytophilic macroglobulin reactive with bacterial protein in mice immunized with ribonucleic acid-protein fractions of virulent *Salmonella typhimurium*.
- *Infect. Immun.*, 1972, 6, (390-397).

- 66 - MERRIT K., JOHNSON A.G. - Studies on the adjuvant action of bacterial endotoxins on antibody formation. Enhancement of antibody formation by nucleic acid.
- J. Immunol., 1965, 94, (417-422).
- 67 - MIDGLEY J.E.M. - The estimation of polynucleotide chain length by a chemical method.
- Biochem. Biophys. Acta, 1965, 108, (340).
- 68 - MILLMANN I., MAGUIRE H.C. Jr., YOUMANS G.P., YOUMANS A.S. - Effect of the H 37 Ra strain of M. tuberculosis and a mycobacterial RNA fraction on tumour growth.
- Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1974, 147, (765-768).
- 69 - MILLMAN I., SCOTT A.W., HALBHERR T., YOUMANS A.S., YOUMANS G.P. - Mycobacterial ribonucleic acid : comparison with mycobacterial cell walls fractions for regression of murine tumor growth.
- Infect. Immun., 1976, 14, (929-933).
- 70 - MISFELDT M.L., JOHNSON W. - Variability of protection in inbred mice induced by a ribosomal vaccine prepared from Salmonella typhimurium.
- Infect. Immun., 1976, 14, (652-659).
- 71 - MORSE S.I. - Biological attributes of staphylococcal cell walls.
- Ann. N.Y. Acad. Sci., 1963, 128, (191).
- 72 - NAKASHIMA I. - Adjuvant action of capsular polysaccharide of Klebsiella pneumoniae on antibody response. I - Intensity of its action.
- J. Immunol., 1972, 108, (1009-1016).
- 73 - NAKASHIMA I., KATO N. - Non specific stimulation of immunoglobulin synthesis in mice by capsular polysaccharide of Klebsiella pneumoniae.
- Immunology, 1974, 27, (179-193).
- 74 - NEUHAUSER S., TEWARI R.P., CINO P.M. - Specificity of immunoprotection induced by immunization with ribosomal preparations from yeast cells of Histoplasma capsulatum.
- Abstr. 74 th Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol., Chicago, 1973, Mm6 (136).
- 75 - O'NEILL G.J., TODD J.P. - Extraction of nucleic acid-from lipopolysaccharide from gram-negative bacteria.
- Nature (London), 1961, 190, (344-345).
- 76 - ORTIZ-ORTIZ L., SOLAROLO E.B., BOJALIL L.F. - Delayed hypersensitivity to ribosomal protein from BCG.
- J. Immunol., 1971, 107, (1022-1026).
- 77 - PALADE G.E., SIEKEVITZ P. - Liver microsomes : an integrated morphological and biochemical study.
- J. Biophys. Biochem. Cytol., 1956, 2, (171).
- 78 - PATTERSON R.J., YOUMANS G.P. - Demonstration in tissue culture of lymphocyte-mediated immunity to tuberculosis.
- Infect. Immun., 1970, 1, (600-603).
- 79 - PETERMAN M.L., HAMILTON M.G. - An ultracentrifugal analysis of the macromolecular particles of normal and leukemic mouse spleen.
- Cancer res., 1952, 12, (373).

- 80 - PINCHUCK P., FISHMAN M., ADLER F.L., MAURER P.H. - Antibody formation : initiation in "non-responder" mice by macrophage synthetic polypeptide RNA.
- Science, 1969, 160, (194-195).
- 81 - PORTELANCE V., BRASSEUR R., BOULANGER R.P. - Factors affecting the immunizing activity of ribosomal fractions isolated from Mycobacterium tuberculosis var. bovis strain BCG.
- Can. J. Microbiol., 1975, 21, (1492-1499).
- 82 - PRESTON P.M., DUMONDE D.C. - Immunogenicity of a ribosomal antigen of Leishmania enriettii.
- J. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1971, 65, (181-187).
- 83 - ROBERT D. - Etude du macrophage alvéolaire dans la protection contre les infections respiratoires par les ribosomes bactériens.
- Doctorat de Spécialité, n° 623, LYON, 1977.
- 84 - SAUNDERS E.S., SOLOTOROVSKY M., TEWARI R.P.
- Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol., 1975, 22, (89).
- 85 - SCHALLA W.O., JOHNSON W. - Immunogenicity of ribosomal vaccines isolated from group A type 14 Streptococcus pyogenes.
- Infect. Immun., 1975, 11, (1195-1202).
- 86 - SMITH R.A., BIGLEY N.J. - RNA-protein fractions of virulent Salmonella typhimurium as protective immunogens.
- Infect. Immun., 1972, 6, (377-383).
- 87 - SMITH R.A., BIGLEY N.J. - Detection of delayed hypersensitivity in mice infected with RNA-protein fractions of Salmonella typhimurium.
- Infect. Immun., 1972, 6, (384-389).
- 88 - SMITH R.L., WYSOCKI J.A., BRUNN J.N., DE COURCY S.J., BLAKEMORE W.S., MUDD S. - Efficacy of ribosomal preparations from Pseudomonas aeruginosa to protect against intravenous pseudomonas challenge in mice.
- J. Reticuloendothel. Soc., 1974, 15, (22-30).
- 89 - SPIRIN A.S., KISELEV N.A., SHAKULOV R.S., BOGDANOV A.A. - Reversible unfolding of the ribosome particles in ribonucleoprotein strands.
- Biochimiya, 1963, 28, (920).
- 90 - SPITNIK-ELSON P. - The preparation of ribosomal protein from Escherichia coli with lithium chloride and urea.
- Biochem. Biophys. Res. Comm., 1965, 18, (557-562).
- 91 - STANLEY W.M. Jr., SALAS M., WAHBA A., OCHOA S. - Translation of the genetic message : factors involved in the initiation of protein synthesis.
- Proc. Nat. Acad. Sci., 1966, 58, (290).
- 92 - SUZUKI K. - Cellular fractions of Listeria monocytogenes in relation to the localization of a protective antigen and monocytoxis producing factor.
- Yonago Acta Med., 1970, 14, (52).

- 93 - SWENDSEN C.L., JOHNSON W. - Humoral immunity to *Streptococcus pneumoniae* induced by a pneumococcal ribosomal protein fraction.
- *Infect. Immun.*, 1976, 14, (345-354).
- 94 - TAKANAMI M. - Preparations of ribosomes and their subunits from *Escherichia coli* cells.
- in L.Grossman and K.Moldave (Ed.) *Methods in Enzymology*, vol. 12, Academic Press Inc., New York, 1967, (491-494).
- 95 - TEWARI R.P. - Immunization against histoplasmosis. In E.Neter and F. Milgrom (Ed.). - *The immune system and Infections diseases*, 4 th Int. Convoc. Immunol. S. Karger, Basel Switzerland, 1975, (451-452).
- 96 - TEWARI R.P., SHARMA O., SOLOTOROVSKY M., LAFEMINA R., BALINT J. - Adoptive transfer of immunity from mice immunized with ribosomes or live yeast cells of *Histoplasma capsulatum*.
- *Infect. Immun.*, 1977, 15, (789-795).
- 97 - THOMAS D.W., WEISS E. - Response of mice to injection of ribosomal fraction from group B *Neisseria meningitidis*.
- *Infect. Immun.*, 1972, 6, (355-363).
- 98 - THOMPSON H.C.W., SNYDER I.S. - Protection against pneumococcal infection by a ribosomal preparation.
- *Infect. Immun.*, 1971, 3, (16-23).
- 99 - THOMPSON H.C.W., EISENSTEIN T.K. - Biological properties of an immunological pneumococcal subcellular preparation.
- *Infect. Immun.*, 1976, 13, (750-757).
- 100 - TISSIERES A., WATSON J.D., SCHLESSINGER D., HOLLINGWORTH B.R. - Ribonucleo-protein particles from *Escherichia coli*.
- *J. Mol. Biol.*, 1959, 1, (221).
- 101 - VENNEMAN M.R., BIGLEY N.J. - Isolation and partial characterization of an immunogenic moiety obtained from *Salmonella typhimurium*.
J. Bacteriol., 1969, 100, (140-148).
- 102 - VENNEMAN M.R., BIGLEY N.J., BERRY L.J. - Immunogenicity of ribonucleic acid preparations obtained from *Salmonella typhimurium*.
- *Infect. Immun.*, 1970, 1, (574-582).
- 103 - VENNEMAN M.R., BERRY L.J. - Experimental salmonellosis : differential passive transfer of immunity with serum and cells obtained from ribosomal and ribonucleic acid-immunized mice.
- *Reticuloendothel. Soc.*, 1971, 9, (491-502).
- 104 - VENNEMAN M.R., BERRY L.J. - Cell mediated resistance induced with immunogenic preparations of *Salmonella typhimurium*.
- *Infect. Immun.*, 1971, 4, (381-387).
- 105 - VENNEMAN M.R., BERRY L.J. - Serum mediated resistance induced with immunogenic preparations of *Salmonella typhimurium*.
- *Infect. Immun.*, 1971, 4, (374-380).

- 106 - VENNEMAN M.R. - Purification of immunologically active RNA preparations of *Salmonella typhimurium* : molecular sieve and anion exchange chromatography.
- *Infect. Immun.*, 1972, 5, (269-282).
- 107 - WEISS E., HILL J.C. - Immunization against *Neisseria* infection.
- *The immune system and infectious diseases*, 4 th Convoc. Immunol. Buffalo, N.Y., (Karger, Basel, 1975), 1974, (423-440).
- 108 - WELLER D.L., SJOGREN R.E. - Chemical heterogeneity of ribosomal protein of *Escherichia coli* examined by electro focusing.
- *Biochem. Biophys. Acta*, 1970, 200, (508-521).
- 109 - WILCOCKSON J. - The use of sodium perchlorate in deproteinization during the preparation of nucleic acids.
- *Biochem. J.*, 1973, 135, (559-561).
- 110 - WINSTON S.H., BERRY L.J. - Antibacterial immunity induced by ribosomal vaccines.
- *Reticuloendothelial. Soc.*, 1970, 8, (13-24).
- 111 - WINSTON S.H., BERRY L.J. - Immunity induced by extracts from *Staphylococcus aureus*.
- *Reticuloendothelial. Soc.*, 1970, 8, (66-73).
- 112 - WORCEL A., GOLDMAN D.S., SACHS I.B. - Properties and fine structure of the ribosomes from *Mycobacterium tuberculosis*.
- *Biochem.*, 1968, 61, (122-129).
- 113 - YOUMANS G.P., MILLMAN I., YOUMANS A.S. - The immunizing activity against tuberculosis infection in mice of enzymatically active particles isolated from extracts of *Mycobacterium tuberculosis*.
- *J. Bacteriol.*, 1955, 70, (557-562).
- 114 - YOUMANS A.S., YOUMANS G.P., MILLMAN I. - Immunogenicity of particles isolated from *Mycobacterium tuberculosis*.
- *Proc. Soc. Biol. Med.*, 1957, 96, (762-768).
- 115 - YOUMANS A.S., YOUMANS G.P. - Further studies on a labile immunogenic particulate substance isolated from *Mycobacterium tuberculosis*.
- *J. Bacteriol.*, 1964, 87, (278-285).
- 116 - YOUMANS A.S., YOUMANS G.P. - Effect mitochondrial stabilizers on the immunogenicity of the particulate fraction isolated from *Mycobacterium tuberculosis*.
- *J. Bacteriol.*, 1964, 87, (1346-1354).
- 117 - YOUMANS A.S., YOUMANS G.P. - Nature of the labile immunogenic substance in the particulate fraction isolated from *Mycobacterium tuberculosis*.
- *J. Bacteriol.*, 1964, 88, (1030-1037).
- 118 - YOUMANS A.S., YOUMANS G.P. - Immunogenic activity of a ribosomal fraction obtained from *Mycobacterium tuberculosis*.
- *J. Bacteriol.*, 1965, 89, (1291-1298).

- 119 - YOUMANS A.S., YOUMANS G.P. - Effect of trypsin and ribonuclease on the immunogenic activity of ribosomes and ribonucleic acid isolated from *Mycobacterium tuberculosis*.
- J. Bacteriol., 1966, 91, (2146-2154).
- 120 - YOUMANS A.S., YOUMANS G.P. - Preparation of highly immunogenic ribosomal fractions of *Mycobacterium tuberculosis* by use of sodium dodecyl sulfate.
- J. Bacteriol., 1966, 91, (2139-2145).
- 121 - YOUMANS G.P., YOUMANS A.S. - Allergenicity of mycobacterial ribosomal and ribonucleic acid preparations in mice and guinea-pigs.
- J. Bacteriol., 1969, 97, (134-139).
- 122 - YOUMANS G.P., YOUMANS A.S. - Recent studies on acquired immunity in tuberculosis.
- in Current topics in microbiology and immunology, vol.48,
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1969, (129-178).
- 123 - YOUMANS A.S., YOUMANS G.P. - Factors affecting immunogenic activity of mycobacterial ribosomal ribonucleic acid preparations.
- J. Bacteriol., 1969, 99, (42-50).
- 124 - YOUMANS A.S., YOUMANS G.P. - Immunogenic mycobacterial ribosomal and ribonucleic acid preparations : chemical and physical characteristics.
- Infect. Immun., 1970, 2, (659-668).
- 125 - YOUMANS A.S., YOUMANS G.P. - Failure of synthetic polynucleotides to affect the immunogenicity of mycobacterial ribonucleic acid and ribosomal protein preparations.
- Infect. Immun., 1971, 3, (149-153).
- 126 - YOUMANS G.P., YOUMANS A.S. - The effect of mycobacterial RNA on the primary response of mice to bovine γ globulin.
- J. Immunol., 1972, 109, (217-221).
- 127 - YOUMANS A.S., YOUMANS G.P. - Mycobacterial extracts and immunity to tuberculosis.
- The Immune System and Infectious diseases. 4 th Int. Convoc. Immunol., Buffalo, N.Y., 1974, (399-410), (Karger, Basel 1975).
- 128 - YOUMANS G.P., YOUMANS A.S. - Implications of immunization against infectious diseases with ribosomal and RNA vaccines.
- The Immune System and Infectious diseases. 4 th Int. Convoc. Immunol., Buffalo, N.Y., 1974, (453-468) (Karger, Basel 1975).
- 129 - YOUMANS A.S., YOUMANS G.P. - The relationship between sedimentation value and immunogenic activity of mycobacterial ribonucleic acid.
- J. Immunol., 1976, 110, (581-586).

